



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA

TESIS

**DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA DE PRE-CONCENTRACIÓN ON-
LINE POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL ANÁLISIS DE
ADITIVOS ALIMENTARIOS EN MUESTRAS DE AGUA.**

**Para obtener el título de
Licenciado en Química**

PRESENTA

Fernanda Estrada Calva

DIRECTOR

Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

CO-DIRECTOR

Dra. Gabriela Islas Guerrero

Pachuca de Soto, Hgo., México, 2024.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 11 de abril de 2024

Número de control: ICBI-D/454/2024
Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UA EH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Química **Fernanda Estrada Calva**, quien presenta el trabajo de titulación **"Diseño de una metodología de pre-concentración on-line por electroforesis capilar en el análisis de aditivos alimentarios en muestras de agua"**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidenta: Dra. Rosa Luz Camacho Mendoza

Secretaria: Dra. Irma Pérez Silva

Vocal: Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Suplente: Dra. Gabriela Islas Guerrero

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI

OAAS/YCC



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A mis padres: por su apoyo incondicional a lo largo de estos cuatro años y medio; por su comprensión en los momentos difíciles y sobre todo por su amor. Este logro es por y para ellos, eternamente agradecida por todo lo que me han dado. Confío en que estén orgullosos de esto.

A mis hermanos: gracias por estar siempre, sin importar nada, por siempre sacarme una sonrisa y darme aliento para lograr lo que hasta ahora he logrado.

A mis sobrinos: por ser la luz de mi vida desde el momento de su nacimiento y siempre darme un motivo para sonreír.

A mi familia: que siempre estuvieron pendientes de cómo estaba y me iba, agradezco que tuvieran confianza en mi desde siempre.

Al Dr. Israel: le agradezco el conocimiento que me ha dado, el tiempo invertido y sobre todo que confiara en mi desde el principio. Confío en no haberlo decepcionado, gracias, por tanto.

A la Dra. Gaby: que siempre estuvo para ayudarme y resolver mis dudas. Agradezco la confianza, calidez y tiempo que me brindo desde el principio.

A David y Hernán: por apoyarme desde el día 1 que llegue al laboratorio, por tener la paciencia necesaria para enseñarme a realizar mis actividades y resolver mis dudas, pero también por las veces que me sacaron una sonrisa con sus ocurrencias. A David por su amistad.

A mis amigas Jessy y Evelin: que siempre confiaron en mí y a lo largo de este proceso estuvieron para darme palabras de aliento y hacerme saber que yo podía, agradezco su amistad incondicional.

Al laboratorio 2: por las risas y buenos momentos a lo largo de este trabajo.

Índice general

1.	Introducción	1
1.1	Contaminantes emergentes	2
1.1.1	Tipos de contaminantes emergentes	2
1.2	Aditivos alimentarios	8
1.2.1	Edulcorantes artificiales	9
1.2.2	Colorantes	11
1.2.3	Conservadores	15
1.3	Métodos analíticos para la determinación de aditivos alimentarios	19
1.3.1	Métodos cromatográficos	19
1.3.2	Métodos no cromatográficos	23
1.3.3	Métodos electroquímicos	25
1.4	Electroforesis capilar	26
2.	Objetivos	33
2.1	Objetivo general	34
2.2	Objetivos específicos	34
3.	Metodología	35
3.1	Equipos y reactivos	36
3.2	Condiciones de análisis para el sistema de CE-UV	36
3.3	Condiciones de análisis para el sistema de LVSS-CE	37

3.4	Pre-tratamiento de muestra	38
4.	Resultados y discusión	39
4.1	Condiciones de análisis para el sistema de CE-UV	40
4.1.1	Efecto del pH	40
4.1.2	Composición del electrolito soporte	41
4.1.3	Voltaje de separación	43
4.1.4	Identificación de señales	45
4.2	Optimización del sistema de LVSS-CE	46
4.3	Obtención de parámetros analíticos	53
4.4	Comparación de los sistemas CE-UV vs LVSS-CE	56
4.5	Aplicación en muestras reales	58
5.	Conclusiones	61
6.	Bibliografía	63

Índice de figuras

Figura 1	Estructura química de la sacarina (SAC); $pK_a=1.6$.	10
Figura 2	Estructura química de aspartame (ASP); $pK_{a1}=3.19$ y $pK_{a2}=7.87$.	10
Figura 3	Estructura química de acesulfame-K (ACE); $pK_a=1.9$.	10
Figura 4	Estructura química de la fenilalanina (FEN); $pK_{a1}=2.2$ y $pK_{a2}=9.31$.	11
Figura 5	Estructura química de la tartrazina (TAR); $pK_{a1}=2.0$, $pK_{a2}=5.0$ y $pK_{a3}=10.86$.	13
Figura 6	Estructura química de rojo allura AC; $pK_a=11.4$.	14
Figura 7	Estructura química de amarillo ocaso (AMA); $pK_{a1}=2.0$ y $pK_{a2}=9.2$.	14
Figura 8	Estructura química de verde ácido brillante; $pK_a=4.8$.	15
Figura 9	Estructura química de benzoato de sodio (BEN); $pK_a=4.62$.	17
Figura 10	Estructura química de EDTA; $pK_{a1}=0.0$, $pK_{a2}=1.5$, $pK_{a3}=2.00$, $pK_{a4}=2.69$, $pK_{a5}=6.13$ y $pK_{a6}=10.37$.	17
Figura 11	Estructura química de propionato de calcio; $pK_a=4.87$.	18
Figura 12	Esquema para la pre-concentración en línea por inyección dinámica de pH; se tiene una discontinuidad del pH en el capilar.	27
Figura 13	Esquema de la pre-concentración en línea por Sweeping; se crea una fase pseudoestacionaria por la retención de los analitos en micelas.	28
Figura 14	Esquema para la técnica por campo amplificado donde a) estado inicial y b) se realiza la pre-concentración por la aplicación del campo eléctrico.	29
Figura 15	Esquema para la técnica isotacoforética (tITP). a) Estado inicial; b) separación por aplicación de voltaje y c) separación finalizada.	30
Figura 16	Diagrama de pre-concentración en línea LVSS. a) Inyección de la muestra, b) aplicación del voltaje en polaridad inversa, c)	31

aplicación del voltaje en polaridad normal y d) separación en el sistema electroforético.

Figura 17	Esquema general del diseño de experimentos central compuesto (CCD).	37
Figura 18	Esquema del pre-tratamiento de muestra: a) Se toman 10 mL de la muestra. b) se filtra la muestra (membrana de nylon), y d) alícuota 1 mL (0.1 mg L ⁻¹ estándar interno).	38
Figura 19	Electroferogramas obtenidos en la evaluación de pH, a) pH=8.0, b) pH=8.5, c) pH=9.0, d) pH=9.5, e) pH=10.0 y f) pH=10.5.	41
Figura 20	Electroferogramas obtenidos en la evaluación de la composición del electrolito de Na ₂ B ₄ O ₇ ; a) 1 mmol L ⁻¹ , b) 3 mmol L ⁻¹ , c) 5 mmol L ⁻¹ , d) 7 mmol L ⁻¹ y e) 9 mmol L ⁻¹ .	42
Figura 21	Electroferogramas obtenidos en la evaluación del voltaje de separación. A) 10 kV, b) 12 kV, c) 14 kV, d) 16 kV y e) 18 kV.	44
Figura 22	Electroferograma obtenido al análisis de una solución de 15 mg L ⁻¹ de E.I (ácido pícrico); SAC, BEN y ACE 30 mg L ⁻¹ ; FEN, ASP, TAR y AMA 90 mg L ⁻¹ . Analizado a 12 kV y 215 nm.	45
Figura 23	Electroferogramas correspondientes a: a) sistema CE-UV y b) sistema LVSS-CE.	46
Figura 24	Electroferogramas obtenidos en la evaluación de la concentración de β-ciclodextrina. A) 0.10 mmol L ⁻¹ , b) 0.25 mmol L ⁻¹ , c) 0.50 mmol L ⁻¹ y d) 0.75 mmol L ⁻¹ .	47
Figura 25	Gráficos de superficie de las interacciones de dos vías para las variables: A: tiempo de carga, B: tiempo de pre-concentración y C: voltaje de pre-concentración.	52
Figura 26	Electroferograma obtenido por el método LVSS-CE bajo las condiciones óptimas para el análisis de una solución de 5 mg L ⁻¹ de E.I (ácido pícrico); SAC, BEN y ACE 1 mg L ⁻¹ ; FEN, ASP, TAR y AMA 3 mg L ⁻¹ . Analizado a 12 kV y 215 nm.	53
Figura 27	Electroferogramas correspondientes a: a) sistema LVSS-CE y	57

b) sistema CE-UV. Analizado a 12 kV y 215 nm; para ambos sistemas los analitos se encuentran a una relación de concentraciones 1:3 mg L⁻¹ (SAC, BEN, ACE: FEN, ASP, TAR, AMA) y E.I. a 5 mg L⁻¹.

Figura 28 Electroferograma corresponde a una muestra positiva para BEN, ambas analizadas bajo las condiciones óptimas. a) estándar donde SAC, BEN y ACE están a 0.15 mg L⁻¹, FEN, ASP, TAR y AMA a 0.45 mg L⁻¹ y E.I. a 0.1 mg L⁻¹. b) muestra con E.I. a 0.1 mg L⁻¹. 58

Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación de pesticidas basada en su toxicidad.	6
Tabla 2	Clasificación de pesticidas basada en el tiempo de vida media de efectividad.	6
Tabla 3	Clasificación de colorantes naturales.	12
Tabla 4	Clasificación de colorantes sintéticos.	12
Tabla 5	Clasificación de conservadores.	16
Tabla 6	Ejemplo de determinación de aditivos alimentarios por métodos cromatográficos.	23
Tabla 7	Determinación de aditivos alimentarios por métodos no cromatográficos.	25
Tabla 8	Ejemplos de determinación de aditivos alimentarios por métodos electroquímicos.	26
Tabla 9	Ejemplos de determinación de aditivos alimentarios por electroforesis capilar.	32
Tabla 10	Tabla de experimentos para CCD de forma (codificada) y decodificada.	49
Tabla 11	Valores de ANOVA para el sistema LVSS-CE; donde A es el tiempo de carga, B el tiempo de pre-concentración y C el voltaje de pre-concentración.	50
Tabla 12	Parámetros analíticos para los sistemas CE-UV y LVSS-CE.	55
Tabla 13	Repetitividad y reproducibilidad para los sistemas CE-UV y LVSS-CE.	56
Tabla 14	Factores de enriquecimiento para cada aditivo.	57
Tabla 15	Concentraciones de las muestras reales positivas.	59
Tabla 16	Comparación de metodologías en la determinación de edulcorantes, conservadores y colorantes.	59

1. Introducción

1.1 Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes (CEs) son sustancias o compuestos químicos, ya sean regulados o no por alguna normativa oficial, cuyas propiedades fisicoquímicas permiten llegar al medio ambiente y originar problemas de contaminación cruzada, en referencia a la transferencia no intencional y en consecuencia provocar daños a la salud humana como: cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, alterar el sistema endócrino, el sistema nervioso central, reproductor o inmunológico, un ejemplo de ello es la contaminación de zonas acuíferas, por lo que se pueden encontrar en orden de trazas (mg L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$) (Gil et al., 2012).

La creciente disponibilidad de contaminantes emergentes ha despertado el interés científico debido a las múltiples afecciones tanto en el medio ambiente, como en seres vivos (Carrasco et al., 2017). Las principales fuentes de contaminación son desechos industriales, tratamiento de aguas, uso doméstico, actividad agrícola y pecuaria.

La contaminación generada varía según el proceso del cual sea derivado el contaminante y su concentración en el ambiente dependerá de que tan seguido sean las descargas en el sitio. Aunque estos se encuentren en niveles traza o ultratrazas, sus efectos son significativos por lo que es importante su remoción (García et al., 2011).

1.1.1 Tipos de contaminantes emergentes

Existe una amplia gama de compuestos químicos considerados como contaminantes emergentes y pueden provenir de compuestos usados con diferentes fines como se enlista a continuación:

Productos farmacéuticos:

Los productos farmacéuticos tienen una larga historia que se hace presente desde la antigüedad, se tiene evidencia de su uso en civilizaciones como la egipcia, romana y griega; sin embargo, en la actualidad, la fabricación y el uso generalizado de estos ha aumentado significativamente tanto en medicina humana como veterinaria, por lo que son considerados como fuentes de contaminación ambiental principalmente por excreciones, así como en la descarga de residuos de plantas tratadoras de agua donde este tipo de compuestos son parcialmente retenidos derivados de procesos industriales

por lo que terminan en cuerpos de agua del tipo superficial y subterráneo (Godínez & Aceves, 2014). Dentro de los fármacos más empleados a nivel mundial se encuentran:

Analgésicos: son la fuente principal de automedicación, comúnmente medicamentos que disminuyen o alivian completamente dolores de cabeza, musculares, entre otros. Los más encontrados son: naproxeno, ibuprofeno, tramadol, levotiroxina y acetaminofén.

Antihipertensivos: medicamentos enfocados en la disminución de riesgo cardiovascular en personas que padecen hipertensión; son un grupo bastante amplio, entre los cuales se encuentran los beta-bloqueadores, el calcio-antagonista, clortalidona, captopril, enalapril, losartan, entre otros.

Antibióticos: fármacos usados en combatir infecciones causadas por virus o bacterias, frenan el desarrollo de la bacteria o la matan. Sin embargo, su uso ha sido relacionado como agente de promotores del crecimiento en la industria ganadera. Por lo que, el consumo de estos productos incrementa de forma directa la ingesta de antibióticos. Dentro de los antibióticos la amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, azitromicina, claritromicina, eritromicina, cefaclor, cefalexina, cefuroxima, suelen ser los más empleados por mencionar algunos (Tejada et al., 2014).

Retardantes de llama:

Los retardantes de llama son compuestos químicos antropogénicos que se agregan a una gran cantidad de productos comerciales para mejorar su resistencia al fuego. Su historia figura desde principios del siglo XX, derivada de los múltiples incendios en edificios y vehículos de la época; el bromuro de tetraetilo fue de los primeros retardantes en ser utilizados, añadido a la gasolina como aditivo para evitar explosiones de los motores en incendios (Martí et al., 2020).

Entre este tipo de CE's se encuentran compuestos derivados de organofosfatos, y compuestos bromados como el polibromodifenil éter, hexabromociclododecano y el decabromodifeniletano. La contaminación ambiental por estos compuestos plantea preocupaciones debido a la bioacumulación en la cadena alimentaria y sus efectos

adversos en la salud humana como: toxicidad, afecciones neurológicas, disruptor endócrino y cáncer (Vargas, 2023).

✚ Productos de cuidado personal:

Los productos de cuidado personal como cremas, lociones, perfumes, maquillaje y de higiene personal tienen presencia en la vida del ser humano desde civilizaciones antiguas como egipcias y romanas, donde eran empleados productos naturales; fue en el siglo XX donde la industria de este tipo de productos tuvo un gran auge desarrollando productos más elaborados y por ende con una mejor comercialización.

Este tipo de productos están destinados a ser usados directamente sobre la piel, dientes, mucosas del cuerpo con el fin de una buena higiene o estética. Van dirigidos a eliminar malos olores, a mejorar el aspecto y tacto de la zona donde se aplique (Molins, 2017).

A diferencia de los productos farmacéuticos, estos pueden introducirse al medio no solo entrando en contacto con los cuerpos de agua, también por medio del aire ya que en algunos casos son compuestos volátiles. Los exfoliantes y productos para el cuidado de la piel contienen microplásticos los cuales entran al medio acuático contaminando ríos y océanos; también contienen ingredientes químicos como parabenos, ftalatos y triclosán los cuales tiene efectos dañinos a la salud humana por ejemplo el envejecimiento prematuro y reacciones alérgicas (Carrasco et al., 2017).

✚ Plastificantes:

Los plastificantes son materiales de baja volatilidad que se añaden a un polímero para aumentar su elasticidad, flexibilidad y fluidez para mejorar su transformación. Estos están presentes en plásticos, resinas epóxicas, selladores dentales, botellas, etcétera (Wilkinson et al., 2017).

La historia de estos compuestos data del siglo XIX, cuando comenzaron a utilizar aceites vegetales, como aceite de ricino y de oliva, para ablandar el caucho natural; por su parte el desarrollo de plastificantes sintéticos comenzó en el siglo XX.

Uno de los compuestos más conocidos y estudiados en la actualidad como agente plastificante es el bisfenol-A, es sumamente usado en la fabricación de resinas epóxicas y plásticos policarbonatos (en empaques de alimentos y agua); es un disruptor endócrino y su estudio ha arrojado que tiene efectos estrogénicos en ratas y desordenes hormonales en humanos que aumentan el riesgo de contraer cáncer de mama, además es un antiandrógeno, es decir, tiene efectos secundarios feminizadores en hombres y anfibios (Siddique et al., 2016).

Los ésteres de ftalatos, usados en plásticos como PVC (polyvinyl chloride por sus siglas en inglés), causan complicaciones en el embarazo, así como problemas en el desarrollo y hormonales. Este tipo de productos llegan como contaminantes al medio ambiente en procesos fabricación, desprendimiento, liberación y descomposición de los mismos, permitiendo su incorporación en el entorno.

Por lo que, se han desarrollado plastificantes alternativos que sean amigables con el ambiente, a su vez se implementan regulaciones para limitar el uso de estos y se fomentan medidas de reutilización y reciclaje de productos plásticos para evitar la liberación de los plastificantes (Herrero et al., 2013).

Pesticidas:

Los pesticidas son sustancias químicas que pueden emplearse de forma individual o en mezcla, que tienen como objetivo destruir, prevenir, repeler o mitigar el crecimiento de plagas y maleza. Pesticidas como: el glifosato, metil azinfos, etil clorpirifos, diazinon, dimetoato, malatión y paratión metílico han sido estudiados durante décadas, sin embargo, actualmente surge la preocupación sobre metabolitos que se producen en su descomposición (Silveira et al., 2018).

Este tipo de contaminantes son fuente de contaminación de zonas acuíferas por medio de escorrentía urbana. Los pesticidas son clasificados por la OMS conforme su grado de toxicidad, definida por el daño agudo que produce a la salud a través de una o varias exposiciones al compuesto (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de pesticidas basada en su toxicidad (Castillo et al., 2020).

Clase	Toxicidad	Ejemplo
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión, glifosato

Otro tipo de clasificación dada a estos compuestos se realiza en función del tiempo de vida media de efectividad (*Tabla 2*):

Tabla 2. Clasificación de pesticidas basada en el tiempo de vida media de efectividad (Jaqués, 2013).

Clasificación	Vida media	Ejemplo
No persistente	De 1 hasta 12 días	Malatión, diazión, carbarilo
Moderadamente persistente	Semanas	Paratión, lannate, glifosato
Persistente	De 1 a 18 meses	DDT, aldrín, dieldrín
Permanente	Más de 18 meses	Hechos a partir de Hg, Pb o As

Drogas:

Las drogas han sido utilizadas por diferentes culturas a lo largo de los años con fines medicinales o recreativos; fueron ampliamente usadas en ceremonias religiosas y fue hasta el siglo XX que se empezó con la síntesis química de este tipo de sustancias.

La contaminación del ambiente es un problema complejo que varía según el tipo de droga y de donde proviene; generan un impacto negativo en la biodiversidad, calidad del agua y salud humana esto a través de su consumo o de la exposición de sustancias químicas tóxicas (Aymara, 2022).

Pueden introducirse al medio ambiente a partir de la síntesis de las sustancias como metanfetaminas y éxtasis que generan residuos químicos peligrosos y son eliminados de forma no adecuada sobre el entorno. Este tipo de contaminante ingresa al agua residual por medio de la excreción humana, saliva, sudor o por la liberación de los residuos de laboratorios clandestinos (Pacheco, 2019).

Dichas sustancias y/o metabolitos, al momento de ser desechados los tratamientos convencionales no son una opción viable debido a la complejidad química de las estructuras, las bajas concentraciones, su resistencia a la degradación biológica, entre otras por lo que se requiere de tratamientos como oxidación avanzada, ozonización, ósmosis, etcétera.

Las drogas más estudiadas son anfetaminas, cocaína, metanfetamina, heroína y la morfina; la concentración que se encuentre en los cuerpos de agua dependerá del día y la hora, aunque siempre son concentraciones reportadas en ng L^{-1} (Granda et al., 2018).

Aditivos industriales:

Los aditivos industriales son sustancias químicas que se añaden a productos manufacturados con el objetivo de mejorar propiedades como la durabilidad, maleabilidad y viscosidad.

La contaminación relacionada con este tipo de aditivos ocurre de diferentes maneras por ejemplo los colorantes textiles liberan compuestos tóxicos en el agua durante el proceso de teñido industrial. Otro ejemplo es el lauril sulfato de sodio que se añade a productos de limpieza como espumante llegando al ambiente por medio de residuos domésticos.

Se tiene una amplia gama de compuestos que al ser liberados al medio ambiente son considerados como CE; dentro de los más populares son: cartuchos clorados, hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos poliaromáticos, resinas y ftalatos. Otros compuestos usados industrialmente como estabilizadores, tensoactivos e inhibidores de corrosión y están principalmente contenidos en los cuerpos de agua subterránea, siendo susceptibles a la resistencia de procesos de degradación natural (Cuenca, 2019).

Productos de tratamiento de aguas residuales:

La historia de los productos químicos para el tratamiento de agua residual está ligada al desarrollo de sistemas de saneamiento, a la creciente importancia del tratamiento de

agua residual y al crecimiento urbano e industrial. Con el paso del tiempo se han desarrollado tratamientos avanzados y efectivos.

El tratamiento de aguas residuales incluye un proceso químico de desinfección, en el cual se forman subproductos que presentan toxicidad crónica; estos subproductos surgen de la oxidación de una gran variedad de componentes en agua como: desinfectantes que reaccionan con materia orgánica, yoduro y bromuro, quedando presentes en el agua “desinfectada”. Sin embargo, la descarga inadecuada de productos químicos también afecta la calidad del agua y del entorno (Pachés, 2020).

Aunque los estudios continúan se cree que la exposición a este tipo de subproductos puede generar afecciones en la salud humana.

1.2 Aditivos alimentarios

Sustancias que se agregan a los alimentos para mantener y mejorar su inocuidad, aspecto, frescura, sabor o textura. Son añadidos de forma intencionada para dotar a los productos de características específicas al consumidor (Bejarano & Suárez, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estudian los riesgos que pueden ocasionar este tipo de aditivos en la salud humana y el comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA) son los encargados de evaluar la inocuidad de los aditivos sintéticos, dando el visto bueno para su utilización; la evaluación se hace con base a los datos bioquímicos, toxicológicos, ensayos en animales y estudios teóricos reportados por la OMS y la FAO (Bejarano & Suárez, 2015).

Dentro de los aditivos más usados se encuentran los edulcorantes, colorantes y conservadores.

1.2.1 Edulcorantes artificiales

Los edulcorantes artificiales son sustancias químicas que se utilizan como sustitutos del azúcar en alimentos y bebidas debido a que tienen un mayor potencial endulzante y son bajos en calorías. Su popularidad va en incremento ya que la ingesta disminuye la cantidad de calorías y al mismo tiempo favorecen el control en el nivel de azúcar en sangre (Joyanes, 2014).

Desde su invención han sido introducidos a la vida diaria contenidos en innumerables productos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

El poder endulzante que puedan tener estas sustancias se mide respecto a la sacarosa y va desde las 30 (ciclamoto) hasta las 37000 (advantame) veces más; incluso, este tipo de aditivos pueden encontrarse combinadas, siempre y cuando no se sobrepasen las dosis recomendadas por la Food & Drugs Administration (FDA) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Figueras, 2021).

Este tipo de aditivos alimentarios pueden encontrarse en diferentes productos como: mermeladas, dulces, gelatinas, productos lácteos, néctares de frutas, vegetales enlatados, bebidas carbonatadas y no carbonatadas, entre otros. Dentro de los edulcorantes artificiales más conocidos y utilizados en la industria alimentaria están sacarina (SAC), aspartame (ASP), acesulfame-K (ACE) y fenilalanina (FEN), los cuales se enlistan a continuación y serán parte del objeto de estudio:

✚ Sacarina (SAC):

De fórmula química $C_7H_5NO_3S$ (*Figura 1*) fue descubierta en 1878 y su poder endulzante es de 200 a 700 veces más que la sacarosa. Esta se caracteriza por ser estable a pH bajo, así como por resistir cambios térmicos elevados y su alta solubilidad en agua cuando está en forma de sales. Industrialmente es usada en mezclas con aspartame y ciclamoto (Mooradian et al., 2017).

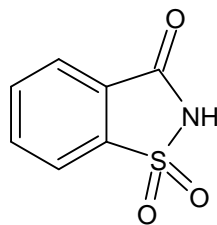


Figura 1. Estructura química de la sacarina (SAC); $pK_a=1.6$.

✚ Aspartame (ASP):

Descubierto en 1965, es un polvo blanco de uso limitado ya que presenta baja solubilidad en agua y una alta sensibilidad a los cambios térmicos, por lo que suele usarse mezclado con acesulfame-K. Tiene un poder endulzante de entre 180 a 200 veces más que la sacarosa (Fernandes et al., 2013); su estructura se visualiza en la *Figura 2*.

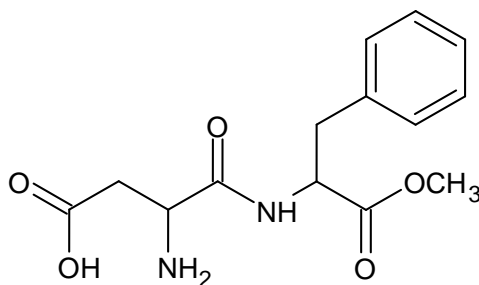


Figura 2. Estructura química de aspartame (ASP); $pK_{a1}=3.19$ y $pK_{a2}=7.87$.

✚ Acesulfame-K (ACE):

Descubierto en 1967, conocido como acesulfame de potasio, es muy soluble en agua y en soluciones alcohólicas-acuosas (con mayor contenido de agua), además resiste altas temperaturas. Tiene hasta 200 veces más dulzor que el azúcar convencional (*Figura 3*) (Zygler et al., 2010).

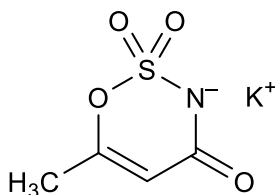


Figura 3. Estructura química de acesulfame-K (ACE); $pK_a=1.9$.

✚ Fenilalanina (FEN):

Es un aminoácido aromático con fórmula química $C_9H_{11}NO_2$ (Figura 4); puede estar contenido en diversas muestras ya que es parte de la formación del ASP (es un metabolito) y puede encontrarse en diferentes muestras endulzadas (Ludwig et al., 2018).

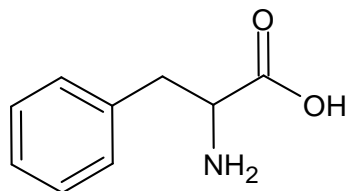


Figura 4. Estructura química de la fenilalanina (FEN); $pK_{a1}=2.2$ y $pK_{a2}=9.31$.

Los edulcorantes artificiales han ganado popularidad debido a las ventajas que pueden tener como su baja aportación calórica. Sin embargo, presentan riesgos en la salud como: diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y gastrointestinales, en algunos casos se les ha relacionado con el desarrollo de cáncer. Su disponibilidad en el medio ambiente se genera a partir de los desechos humanos por el alto consumo de los edulcorantes en la vida cotidiana; estos compuestos no son metabolizados por el cuerpo humano y por ende son desechados en la orina, llegando así a los medios acuáticos (Murray et al. 2016; Roca et al. 2018).

1.2.2 Colorantes

Los colorantes han sido utilizados durante décadas, son compuestos derivados de materia vegetal, animal, así como de algunos minerales. Dentro de la química un colorante es una sustancia capaz de absorber ciertas longitudes de onda del espectro de luz visible; por su parte dentro de la industria, sobre todo alimentaria, es toda sustancia química que proporciona tinte a un producto y son usados para mejorar la apariencia y devolver el color natural que se pierde durante el proceso de fabricación (García, 2023).

Este tipo de compuestos son de suma importancia en la fabricación de un producto, permiten en la mayoría de los casos mejorar la apariencia en un producto terminado, y así captar la atención del consumidor. Sin embargo, no todos los productos pueden

contener estos compuestos a menos que haya disposiciones específicas que avalen su uso, por ejemplo, el agua embotellada, azúcar, sal, entre otros (Zaruma et al., 2018). Los colorantes pueden clasificarse como naturales o sintéticos, mientras que en esa clasificación existen otros subgrupos, tal y como se muestra en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Clasificación de colorantes naturales (Cerrón & Unterlass, 2018; Guardiola, 2020).

Hidrosolubles	Liposolubles	Minerales
Curcumina	Carotenoides	Carbón vegetal
Cochinilla	Clorofilas	Dióxido de titanio
Rojo de remolacha	Xantofilas	Aluminio
Caramelo		Oro
Antocianos		Plata

Mientras que los sintéticos pueden clasificarse como azoicos y no azoicos; aquellos que son azoicos deben su color al grupo azo (-N=N-) que se encuentra conjugado con anillos aromáticos en ambos extremos (*Tabla 4*).

Tabla 4. Clasificación de colorantes sintéticos (Guardiola, 2020; Serrano et al., 2012).

Colorantes azoicos	
Tartrazina	Rojo Allura AC
Amarillo anaranjado	Negro brillante BN
Azorrubina	Marrón FK
Amaranto	Marrón HT
Rojo cochinilla	Litol Rubina BK
Colorantes no azoicos	
Azul patentado V	Verde ácido brillante
Carmín de índigo	Azul brillante FCF
Amarillo de quinoleína	Eritrosina

Los colorantes sintéticos son solubles en agua, lo que facilita su uso dentro de la industria alimentaria, sus formas más comunes de uso son en sales sódicas, líquidos en

materiales pastosos, sin embargo, pueden también usarse de forma insoluble en lacas con hidróxido de aluminio, estos se agregan directamente sobre sólidos evitando que el color desaparezca; este tipo de aditivos se añaden al final de los procesos de fabricación debido a que la mayoría de los productos se desmineralizan y pierden propiedades como el color, por diferentes factores como el calor aplicado en el proceso. Este tipo de colorantes son resistentes a tratamientos térmicos, cambios de pH y de luz. Dentro de los colorantes sintéticos, los azoicos como la tartrazina, amarillo ocaso y rojo allura han sido de los más usados en la industria alimentaria.

✚ Tartrazina (TAR):

También conocido como Amarillo 5 (*Figura 5*), es un colorante azoico soluble en agua, brinda un color amarillo a los alimentos y bebidas y suele usarse en combinación con otros como el azul brillante y el verde S, dando en conjunto tonalidades verdosas. Es uno de los colorantes que más alergias causa y es estudiado por su presunta contribución a residuos cancerígenos.

Esta generalmente contenido en: saborizantes en polvo, dulces, helados envasados, salsas y condimentos (Coaquira, 2018; Rodríguez et al., 2013).

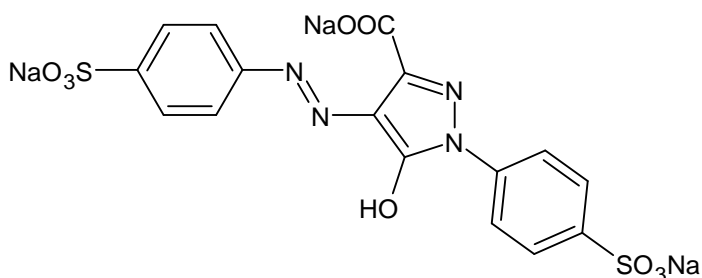


Figura 5. Estructura química de la tartrazina (TAR); $pK_{a1}=2.0$, $pK_{a2}=5.0$ y $pK_{a3}=10.86$.

✚ Rojo Allura:

Compuesto sintético azo proporciona una tonalidad roja; tiene presentación de sal disódica de color rojo intenso, soluble en agua. Se obtiene a través del acoplamiento azoico del petróleo, con estructura química que se observa en la *Figura 6*.

Se encuentra contenido en gomitas, postres envasados, bebidas sin alcohol, suplementos alimentarios y cosméticos (Ensuncho et al., 2015; Rodríguez et al., 2013).

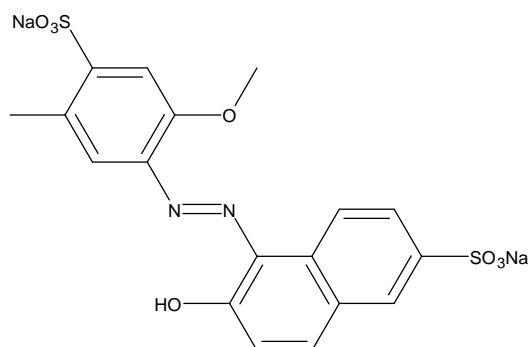


Figura 6. Estructura química de rojo allura AC; $pK_a=11.4$.

✚ Amarillo ocaso (AMA):

Colorante sintético de tonalidad amarilla intenso a anaranjado (*Figura 7*), perteneciente al grupo de azoicos, es soluble en agua y suele estar en combinación con la tartrazina y el amaranto para dar tonos marrones. Es comúnmente usado en sopas, helados, salsas, dulces y pan (Fasanando & Vásquez, 2018; Rodríguez et al., 2013).

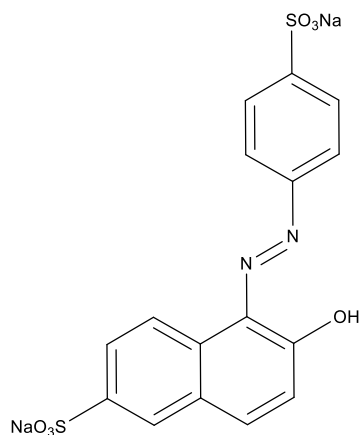


Figura 7. Estructura química de amarillo ocaso (AMA); $pK_{a1}=2.0$ y $pK_{a2}=9.2$.

✚ Verde ácido brillante:

Tiene una gama de color entre verde y azul oscuros (*Figura 8*), es derivado del triarilmetano y suele usarse en combinación con otros colorantes para dar tonalidades en verde, sobre todo en verduras enlatadas que ven su color alterado por la destrucción de la clorofila (Juan, 2013). Es usualmente ocupado en refrescos, productos de confitería (dulces, lunetas, gomitas) y chicles.

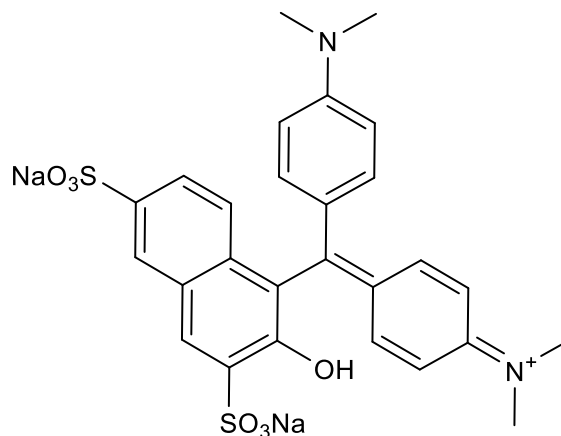


Figura 8. Estructura química de verde ácido brillante; $pK_a=4.8$.

Los colorantes más utilizados en la industria de alimentos son tartrazina (TAR) y amarillo ocaso (AMA), que pueden manejarse de forma individual o en mezcla, por lo que serán considerados como parte de los analitos de interés.

1.2.3 Conservadores

Son sustancias que se añaden a los alimentos para inhibir la presencia de bacterias, como los ácidos orgánicos que son conservadores con capacidad bacteriostática, es decir, no eliminan a los microorganismos, solo les frenan su crecimiento e impiden su reproducción (Sauceda, 2011).

Los conservadores pueden clasificarse como: de uso externo que solo son medidas sanitarias como refrigeración o envasado; y de uso interno, que es la implementación de químicos sobre el alimento. Este último tipo puede subdividirse en tres, como se observa en la siguiente tabla (*Tabla 5*):

Tabla 5. Clasificación de conservadores (Serrano et al., 2012).

Tipo	Descripción	Ejemplo
Antimicrobianos	Actúan sobre bacterias, hongos, mohos y levaduras.	Benzoatos, sorbatos, propionatos, nitratos.
Antioxidantes	Actúan contra el proceso de enraizamiento de los alimentos.	Butilhidroxianisol
Quelantes	Eliminan los metales de la Composición química del alimento.	Ácido Etilendiaminotetraacético disódico (EDTA)

Conservadores antimicrobianos como los compuestos de sorbato son comúnmente usados en quesos, frutas y verduras procesados, en productos de panadería, derivados de la papa y salsas; el ácido benzoico y el benzoato son utilizados en productos lácteos, productos fermentados, a base de pescado y confitería. Los antioxidantes como los ascorbatos están presentes en productos de panadera, frutas, verduras, jugos, grasas y aceites. Por su parte quelantes como el EDTA se encuentra presente en helados, bebidas gaseosas y no gaseosas, en aderezos y margarinas (Beristain et al., 2012).

🚦 Benzoato de sodio (BEN):

Sal en forma de cristales o polvo blanco de fórmula química $C_7H_5NaO_2$ (Figura 9), es inodoro e insípido, soluble en agua lo que lo hace ideal para ser usado en alimentos y bebidas sin alterar su sabor. Actúa como conservante inhibiendo el crecimiento de levaduras, mohos y bacterias en bebidas y alimentos ácidos, tiene la capacidad de bajar el pH del producto generando un ambiente no favorable para el desarrollo de microorganismos. Prolonga la vida útil de refrescos, salsas, aderezos y productos enlatados (León, 2017).

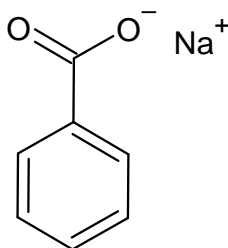


Figura 9. Estructura química de benzoato de sodio (BEN); $pK_a=4.62$.

✚ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA):

Polvo blanco cristalino que actúa como agente quelante al formar complejos termodinámicamente estables con iones metálicos y evita que estos participen en reacciones no deseadas. Los niveles de uso están regulados para evitar riesgos en la salud humana y garantizar una seguridad alimentaria (*Figura 10*) (Cagnasso et al., 2007).

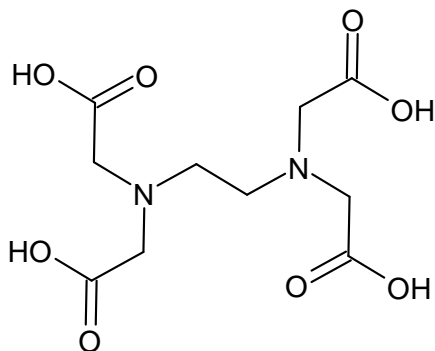


Figura 10. Estructura química de EDTA; $pK_{a1}=0.0$, $pK_{a2}=1.5$, $pK_{a3}=2.00$, $pK_{a4}=2.69$, $pK_{a5}=6.13$ y $pK_{a6}=10.37$.

✚ Propionato de calcio:

Presente en forma de polvo blanco con una estructura química $(C_3H_5O_2)_2Ca$ (*Figura 11*); baja solubilidad, inhibe el crecimiento de mohos y levaduras en productos de panadería y alimentos horneados; actúa disminuyendo el pH del producto creando un ambiente propicio para el nulo crecimiento de microorganismos además de mantener su frescura y calidad en un periodo de tiempo más amplio (Belz et al., 2012; Zhang et al., 2015).

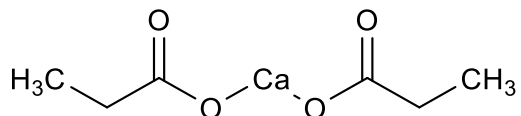


Figura 11. Estructura química de propionato de calcio; $pK_a=4.87$.

Pueden tenerse consecuencias negativas hacia la flora, fauna y seres humanos derivados del consumo y presencia de los aditivos alimentarios. Existe la incertidumbre sobre los daños que se tienen en la salud debido al consumo continuo de este tipo de colorantes, actualmente se hacen estudios sobre la inocuidad toxicológica de los mismos; el abuso de estos puede generar efectos en la salud del que los consume como: alteraciones hormonales, cáncer, daños neurológicos, bajo peso al nacer, retraso del crecimiento intrauterino, defectos congénitos, aborto espontáneo, afecciones dermatológicas, favorece a la hiperactividad, defectos en el ADN, alteraciones en el microbiota, entre otros. Además, no se descartan la contaminación del suelo y agua (Hidalgo, 2022).

Los aditivos alimentarios pueden terminar en aguas superficiales, subterráneas, incluso en agua para uso humano; la fuente principal de contaminación del medio acuático es el agua residual no tratada que llega al medio a partir de la industria y sus desechos, también se atribuye al mal alcantarillado de las zonas urbanas, donde estos aditivos llegan al agua residual por medio de los desechos humanos (Eckstein & William, 2011).

De los conservadores mencionados anteriormente destacamos el uso del benzoato de sodio (BEN) al ser comúnmente usado en la industria, por lo que forma parte de los analitos de interés.

Es por ello que se han incentivado el desarrollo de metodologías analíticas en la determinación de aditivos alimentarios para garantizar la seguridad, calidad y legalidad de los alimentos, es decir, al conocer y controlar los aditivos en los alimentos se evitan riesgos en la salud, asegurando un correcto etiquetado en los empaques permitiendo al consumidor la toma de decisiones sobre su dieta de manera informada. Dentro de los

métodos analíticos su elección depende de la naturaleza de los analitos y del objetivo del análisis; en algunos casos se hace uso de diversas técnicas para detectar la presencia y deducir la identidad de los aditivos.

1.3 Métodos analíticos para la determinación de aditivos alimentarios

La importancia ambiental en el estudio de contaminantes emergentes como los aditivos alimentarios, ha generado la necesidad de desarrollar metodologías analíticas, capaces de detectar los analitos a diferentes intervalos de concentración. Los sistemas que se han propuesto aportan una serie de ventajas e inconvenientes para su determinación en diferentes matrices. Las metodologías más reportadas para el análisis de aditivos alimentarios son las técnicas de separación instrumentales como electroforesis capilar, cromatografía de gas y cromatografía de líquidos de alta resolución.

1.3.1 Métodos cromatográficos

Cromatografía en columna:

Permite su uso en la separación y determinación de una gran variedad de compuestos, tiene inicios en el siglo XX cuando el botánico ruso Mikhail Tsvet utilizó una columna de vidrio con partículas adsorbentes para la separación de pigmentos de plantas (Quispe et al., 2012).

Es una técnica de separación en la que una columna cilíndrica se llena con un material adsorbente (fase estacionaria (FE)) que permite la separación de los componentes de una muestra en función con la interacción que tiene con la fase estacionaria. La descripción básica de su funcionamiento se describe a continuación:

1. Se llena el cilindro con el adsorbente regularmente se usa sílice en gel, alúminas o resinas para el intercambio de iones.
2. Se disuelve la muestra (fase móvil (FM)) en un solvente adecuado (según la naturaleza de la muestra) y se carga en la parte superior de la columna.
3. Se agrega eluyente (solvente) a la columna; este se usa para arrastrar a muestra a través de la columna. Los diferentes componentes de la

FM interactúan de manera diferente con la FE generando una separación de los componentes conforme salen de la columna.

4. Las fracciones que van saliendo de la columna se recogen en frascos diferentes y posteriormente son analizadas para determinar su identidad.

Esta es una técnica versátil que permite la separación de una gran variedad de compuestos basada en sus propiedades químicas y su interacción con la FE (Ruíz, 2020).

Cromatografía en capa fina:

Técnica que permite la separación de componentes químicos en función de su capacidad de migración a través del papel adsorbente. La metodología básica de esta técnica se enlista a continuación:

1. Se elige un papel adsorbente poroso, se marca una línea horizontal en uno de los extremos y se le denomina “línea de origen”.
2. La muestra se disuelve en el solvente adecuado y en la línea de origen se coloca un pequeño volumen de la muestra en forma de gotas, todas sobre el mismo punto.
3. El papel se coloca en una cámara cerrada o en un recipiente con un volumen de solvente que llegue a la línea de origen. El solvente va ascendiendo por el papel y arrastra los componentes de la muestra separándose de acuerdo con la velocidad a la que migran por el papel.
4. Una vez que el solvente abarca todo el papel este se pone a secar y la separación de los componentes se verá reflejada en forma de manchas, estas serán visibles con ayuda de reactivos específicos dependiendo de la naturaleza de la muestra. La distancia recorrida por los componentes se mide respecto de la línea de origen y se compara con la distancia que recorre el solvente.

Es una técnica versátil y económica especialmente útil para separar e identificar pigmentos, aminoácidos y compuestos orgánicos (Vallejo et al., 2021).

✚ Cromatografía de gases:

Desarrollada en 1950 por los investigadores A. J. P. Martin y R. L. M. Synge, usada para separar y cuantificar componentes de una muestra gaseosa o volátil. Su procedimiento es el siguiente:

1. Se introduce la muestra mediante una inyección siendo la muestra calentada en el inyector para convertirla en vapor.
2. Ya que la muestra está vaporizada se introduce a la columna cromatográfica, a medida que la muestra pasa por la columna los componentes interactúan con la fase estacionaria (FE) y la fase móvil (gas inerte) provocando la separación de los componentes en función a la afinidad con la FE.
3. Una vez que sale la muestra de la columna los componentes pasan por un detector que registra la presencia y cantidad de cada uno.
4. Los datos registrados por el detector se usan para generar un cromatograma en donde cada pico corresponderá a un componente separado.

Es una técnica adecuada para separar y analizar compuestos volátiles, hidrocarburos y compuestos orgánicos; es rápida y precisa (Stashenko & Martínez, 2010).

✚ Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC):

Desarrollada en la década de 1960 y permitió una mejor resolución y separación de los componentes en comparación con los métodos mencionados anteriormente.

1. Se inyecta la muestra en la válvula de inyección, la muestra llega a una corriente de solvente (FM) que fluye por la columna. La columna va rellena con fase estacionaria (FE).

2. Conforme la muestra y la fase móvil fluyen en la columna los componentes se separan en función de su interacción con la fase estacionaria.
3. Los componentes separados pasan a un detector que registra la presencia y cantidad de cada uno; con los datos obtenidos se genera un cromatograma en el que cada pico representa un componente diferente.

Esta técnica se usa en diferentes campos como química analítica, bioquímica, farmacología, industria de alimentos, etc. Se ha vuelto una herramienta esencial por su capacidad para separar compuestos con alta precisión (Ali, 2022).

Este tipo de técnicas presentan desventajas y limitaciones, por ejemplo, el uso de solventes orgánicos que pueden ser costosos y contaminantes para el medio ambiente; el tiempo de análisis va aumentando conforme aumenta la complejidad de la muestra, es decir, a mayor número de componentes el tiempo de análisis es mayor. Para el caso de HPLC presenta sensibilidad a los cambios de temperatura y si no se realiza una limpieza adecuada entre análisis se generan problemas de contaminación (Carmona, 2015).

En la *Tabla 6* se enlistan algunos ejemplos en la determinación de aditivos alimentarios como: aspartame (ASP), acesulfame (ACE), sacarina (SAC), ciclamato y sucralosa, en los cuales se han empleado HPLC, capa fina, gases, entre otros, con límites de detección en el orden de mg L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$ en muestras complejas de agua residual, bebidas carbonatadas, agua potable, así como en algunas muestras biológicas (planta: *Stevia rebaudiana*) por métodos cromatográficos, se menciona el tipo de muestra y sus respectivos límites de detección.

Tabla 6. Ejemplo de determinación de aditivos alimentarios por métodos cromatográficos.

Aditivos	Método cromatográfico	Tipo de muestra	LOD	Referencia
ASP, ACE, sucralosa, ciclamato, neohesperidina	HPLC	Agua residual	0.001 - 0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$	Arbeláez et al, 2015
SAC	Capa fina	Stevia rebaudiana	-	Giraldo et al., 2005
ACE, SAC, ASP y ciclamato	HPLC	Bebidas carbonatadas	0.019 - 0.89 mg L^{-1}	Zhu et al., 2005
9,10-fenantrenoquinona	Gases	Agua residual	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	Serrano, 2021
ACE, ASP, SAC, ciclamato, sucralosa y neohesperidina	HPLC	Agua	0.006 - 8.3 $\mu\text{g L}^{-1}$	Ordóñez et al., 2012

1.3.2 Métodos no cromatográficos

Son técnicas de análisis químico que se utilizan para separar, identificar y cuantificar sustancias sin depender, como su nombre lo indica, de la cromatografía. Cada método está basado en diferentes principios de separación y detección, algunos de los más usados para la separación de aditivos alimentarios son:

✚ Espectroscopía:

Se utilizan la espectroscopía en el ultravioleta-visible (UV-Vis), fluorescencia, resonancia magnética nuclear (RMN) y de infrarrojo (IR) para identificar y cuantificar aditivos alimentarios en función de su absorción o emisión de luz en ciertas longitudes de onda. Está basada en la interacción entre la materia y la radiación electromagnética.

1. Espectroscopía UV-Vis: usada para estudiar la absorción o reflexión de la luz en la región UV y visible del espectro electromagnético. Identifica la presencia de compuestos con enlaces dobles o conjugados.
2. Espectroscopia de fluorescencia: se basa en la emisión de luz por ciertos compuestos cuando son excitados por la radiación UV-Vis.
3. Espectroscopia de RMN: útil para determinar la estructura basándose en la interacción de sus núcleos atómicos con un campo magnético.
4. Espectroscopia de IR: está basada en la absorción de radiación infrarroja por los enlaces químicos de la muestra. Identifica grupos funcionales en compuestos orgánicos e inorgánicos (Cantellano, 2015).

✚ Espectrometría de masas (MS):

Utilizada para identificar y cuantificar compuestos químicos en una muestra, determina su estructura molecular y su masa. Se ioniza la muestra convirtiéndola en iones cargados estos se separan en función de la relación masa-carga (m/z); el detector registra la intensidad de los iones a medida que pasan por el espectrómetro, el espectro resultante muestra picos correspondientes a los iones de la muestra.

Es un método sensible, selectivo, ampliamente aplicable y tiene la capacidad de determinar la estructura molecular de compuestos desconocidos (Peña, 2015).

De acuerdo con su factibilidad la *Tabla 7* muestra la aplicación de métodos no cromatográficos en el análisis de aditivos alimentarios como: SAC, ACE, ASP y sucralosa, donde se emplean espectrofotometría, infrarrojo, espectroscopia UV-Vis, entre otras, en muestras complejas de jugos dietéticos, jugos, bebidas azucaradas y edulcorantes no calóricos comerciales.

Tabla 7. Determinación de aditivos alimentarios por métodos no cromatográficos.

Aditivos	Método no cromatográfico	Tipo de muestra	LOD	Referencia
SAC	Espectrofotometría	Edulcorantes no calóricos	2.8393 mg L ⁻¹	Weinert et al., 2004
ASP, ACE y sucralosa	Infrarrojo	Jugos dietéticos	10.2 mg L ⁻¹	Cuellar, 2013
SAC y ACE	Espectroscopía UV-Vis	Jugos	0.32 y 0.09 mg L ⁻¹	Llamas et al., 2008
ASP, ACE y sucralosa	Espectroscopía UV-Vis	Bebidas azucaradas	-	Lara, 2022

1.3.3 Métodos electroquímicos:

Estos métodos están basados en las propiedades electroquímicas de las muestras. Se tienen la voltamperometría y la polarografía como ejemplo de estos métodos.

1. Voltamperometría: implica la aplicación de un potencial eléctrico en una celda electroquímica mientras se registra la corriente eléctrica resultante. Se utiliza en una variedad de aplicaciones que van desde la detección de analitos en soluciones hasta la caracterización de electrodos.
2. Polarografía: utiliza un electrodo de gota de mercurio en una solución de electrolito soporte. Se basa en la formación de amalgamas y la reducción de especies en el electrodo. Es usada en la determinación de compuestos como metales, iones y compuestos orgánicos.

La elección de la técnica a usar dependerá de la aplicación específica y de las características de las muestras que vayan a ser analizadas. Ambas permiten el estudio detallado de reacciones electroquímicas y la determinación de concentraciones de especies electroactivas en solución (Rodrigo et al., 2014). Algunos ejemplos se muestran en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Ejemplos de determinación de aditivos alimentarios por métodos electroquímicos.

Aditivos	Método electroquímico	Tipo de muestra	LOD	Referencia
ASP	Biosensor amperométrico	Bebidas	0.7358 mg L ⁻¹	Kirgöz et al., 2006
Sucralosa	Sensor de micropartículas de plata	Agua	0.1 a 1.9 µg L ⁻¹	Baez, 2017
SAC	Valoración potenciométrica con electrodo de plata	Edulcorantes comerciales	2.5 mg L ⁻¹	Carlioni et al., 2003
Formaldehído	Sensor de micropartículas de cadmio	Agua	0.2 a 3.1 µg L ⁻¹	Baez, 2017

1.4 Electroforesis capilar

Electroforesis capilar (CE por sus siglas en inglés) es una técnica de separación basada en la migración electroforética de iones o moléculas cargadas en un campo eléctrico a través de un capilar.

El capilar usado en CE es un tubo delgado y estrecho de sílice o polímero en el cual se aplica un campo eléctrico a través de electrodos en los extremos del capilar; el campo crea una diferencia de potencial que induce la migración de los iones (analitos de interés) a través del capilar. La velocidad de migración dependerá de la carga neta de la molécula y de su tamaño, por lo que moléculas pequeñas y con mayor carga migran más rápido generando la separación. En la salida del capilar se tiene un detector que registra la intensidad de la señal en función del tiempo; con los datos se obtiene un cromatograma donde cada señal analítica representa la separación de los analitos de interés (Doroteo, 2012).

Para realizar una identificación de cada pico pueden usarse estándares conocidos y la cuantificación se realiza en función de la intensidad de cada señal obtenida. Dentro de

la electroforesis capilar, se tiene la modalidad de electroforesis capilar de zona (CZE): Separación de moléculas cargadas de acuerdo con la relación masa/carga, en función de la movilidad electroforética en el campo eléctrico aplicado. Electroforesis capilar micelar (MEKC): Separación en función de la interacción con las micelas del tensoactivo. Favorece la separación de compuestos neutros, sin embargo, también de compuestos con carga. Electroforesis capilar en fase inversa (CE-IF): La separación se lleva a cabo por las diferencias de interacción entre las moléculas y la fase estacionaria no acuosa (Quiroga, 2013).

Dentro de las múltiples ventajas que presenta la electroforesis capilar, es la posibilidad del desarrollo de técnicas de pre-concentración en línea dentro de la cual destacan: inyección dinámica de pH, por barrido (Sweeping), por campo amplificado (FASS), técnicas isotacoforéticas y por volumen de muestra (LVSS); las cuales se describen a continuación.

✚ Inyección dinámica de pH.

El fundamento de esta pre-concentración se originó en 1990 a partir del trabajo de Aebersold y Morrison. Implica tener una discontinuidad de pH en el capilar; en este se lleva a cabo la migración electroforética de los analitos, a medida que estos migran el pH del electrolito soporte se ajusta de forma controlada favoreciendo que los analitos de interés se concentren en una región específica del capilar (*Figura 12*) (Zhu et al., 2016).

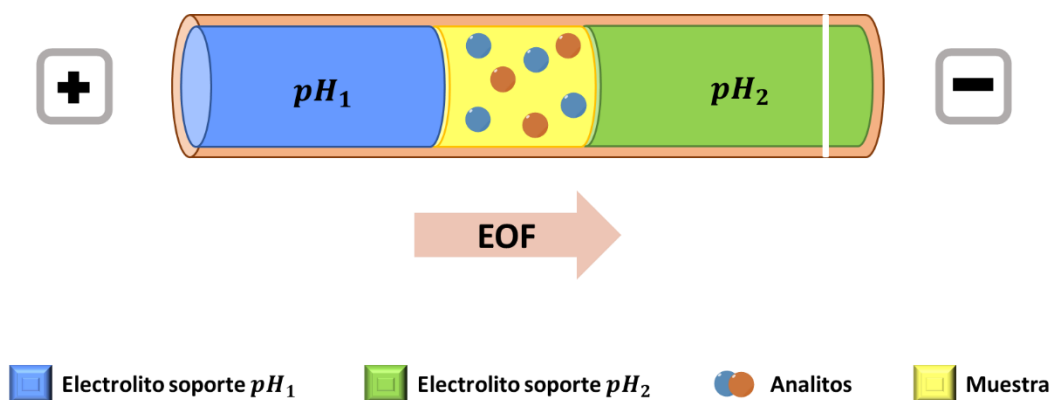


Figura 12. Esquema para la pre-concentración en línea por inyección dinámica de pH; se tiene una discontinuidad del pH en el capilar.

Es importante tener en cuenta que debe haber diferencia en la movilidad de los analitos, de manera que cuando este pase de un pH a otro haya un cambio de velocidad asociado. Permite una mejora en la sensibilidad de la detección de los analitos por lo que se reporta su uso en la pre-concentración y separación de péptidos, aminoácidos, proteínas, fármacos, entre otros (Xu et al., 2015).

✚ Por barrido (Sweeping).

También conocida como sweeping es una técnica desarrollada de forma inicial para MEKC, es decir, para analitos neutros y se basa en la migración de los analitos que están retenidos en micelas (fase pseudoestacionaria); la interacción entre la fase pseudoestacionaria y los analitos permite la pre-concentración (*Figura 13*).

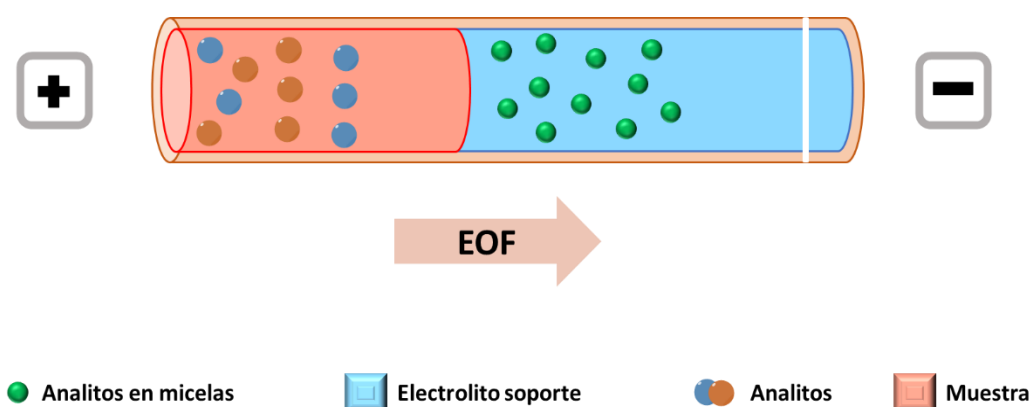


Figura 13. Esquema de la pre-concentración en línea por Sweeping; se crea una fase pseudoestacionaria por la retención de los analitos en micelas.

Esta técnica tiene diferentes aplicaciones en el campo de la química analítica como: detección de analitos traza, análisis de muestras diluidas (muestras biológicas, ambientales o farmacéuticas), separación y cuantificación de mezclas complejas (proteínas o polímeros), análisis de biomoléculas (ácidos nucleicos y carbohidratos), entre otros (Xu et al. 2015).

✚ Campo amplificado (FASS).

La técnica de pre-concentración por campo amplificado (FASS por sus siglas en inglés Field-Amplified Sample Stacking) se basa en la aplicación de un campo eléctrico

amplificado en una zona específica del capilar que favorece la concentración de los analitos antes de ser detectados; los analitos migran hacia la zona donde el campo eléctrico es mayor siendo detectados a manera que migran. El campo eléctrico aplicado puede crearse mediante electrodos especiales o técnicas de modulación de campo. Esta técnica de pre-concentración tiene una variación llamada inyección por campo amplificado (FASI por sus siglas en inglés field-amplified sample injection) en la que se tiene el mismo principio que en FASS, pero se inyecta de forma electrocinética un mayor volumen de muestra y se realiza una optimización de la conductividad eléctrica para generar los campos eléctricos (Ma et al., 2016).

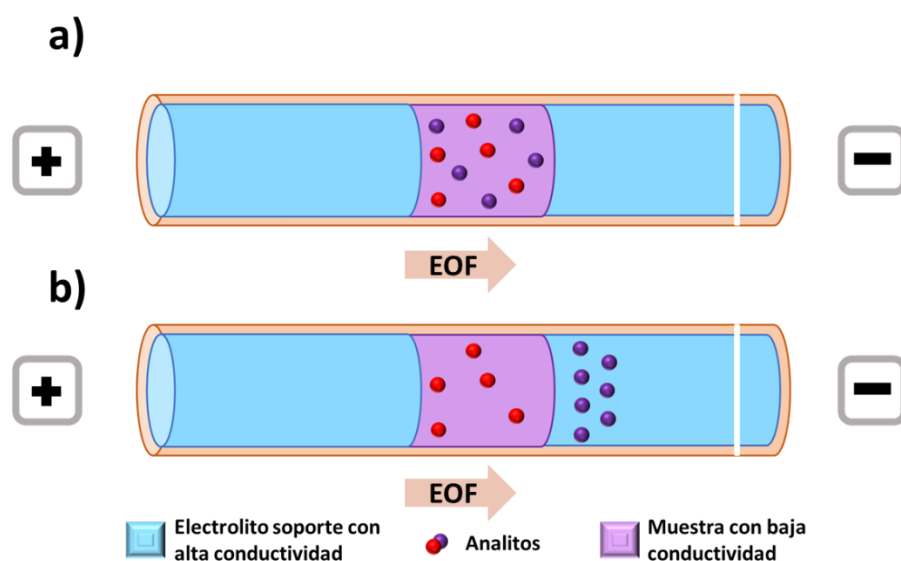


Figura 14. Esquema para la técnica por campo amplificado donde a) estado inicial y b) se realiza la pre-concentración por la aplicación del campo eléctrico.

Es una técnica eficaz permite mejorar la sensibilidad, útil en el campo de la química analítica, investigación biomédica y la industria farmacéutica, aplicada a muestras de baja concentración, biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos), polímeros y contaminantes en bebidas y alimentos (Tascón, 2015).

⚡ Técnicas isotacoforéticas (tITP).

Técnica usada para la separación de analitos en función a la movilidad en un sistema de electrolitos; los analitos son separados de manera sucesiva dependiendo del orden de disminución de la movilidad electroforética. La muestra se introduce entre un

electrolito soporte inicial y uno terminal, cuando se aplica el voltaje de separación se genera una concentración de las bandas y es determinada por la concentración del ion más cercano (*Figura 15*). Este principio puede utilizarse como pre-concentración y es denominado isotacoforesis capilar transitoria (tITP por sus siglas en inglés transient isotachopheresis); dentro de esta existen diferentes alternativas para la pre-concentración por ejemplo emplear un electrolito soporte con baja movilidad electroforética, seguido del electrolito líder y de la muestra (Crevillén et al. 2017).

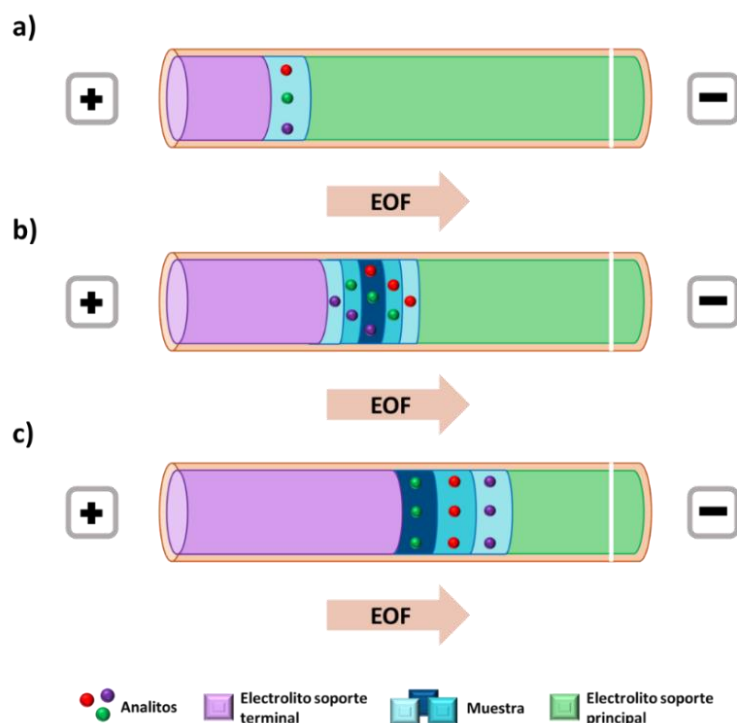


Figura 15. Esquema para la técnica isotacoforética (tITP). a) Estado inicial; b) separación por aplicación de voltaje y c) separación finalizada.

Dentro de esta técnica es importante la elección del electrolito líder y terminal por lo que puede hacerse uso de simulaciones de computadora.

Tiene diversas aplicaciones, entre ellas tenemos el análisis de aminoácidos, muestras biológicas, determinación de iones metálicos, en química ambiental, clínica o ciencias de los materiales para el estudio de aniones y cationes, tiene aplicación en el análisis forense para la detección de drogas y sustancias tóxicas, entre otras (Tascón, 2015).

✚ Por volumen de muestra (LVSS).

La pre-concentración por Large Volume Sample Stacking (LVSS por sus siglas en inglés) se basa en la inyección de un gran volumen de muestra en el sistema de CE; permite concentrar los analitos antes de la separación y detección.

La metodología de pre-concentración LVSS se basa en cuatro etapas principales: 1) inyección de muestra, 2) aplicación del voltaje en polaridad inversa, provocando la apilación de los analitos de interés en la zona inicial del capilar (pre-concentración), 3) y 4) aplicación del voltaje en polaridad normal en el sistema de separación electroforético a las condiciones ideales (*Figura 16*) (Flores, 2019).

Se inyecta un volumen significativo de muestra en el capilar, se aplica un voltaje en polaridad inversa que genera que los analitos migren de forma lenta hasta la zona de inyección, se asegura una retención de los analitos y la expulsión de la fase acuosa del capilar. Una vez realizada la pre-concentración se aplica un voltaje en polaridad normal para que pueda llevarse a cabo la separación y análisis de los analitos de interés (Medrano et al., 2019).

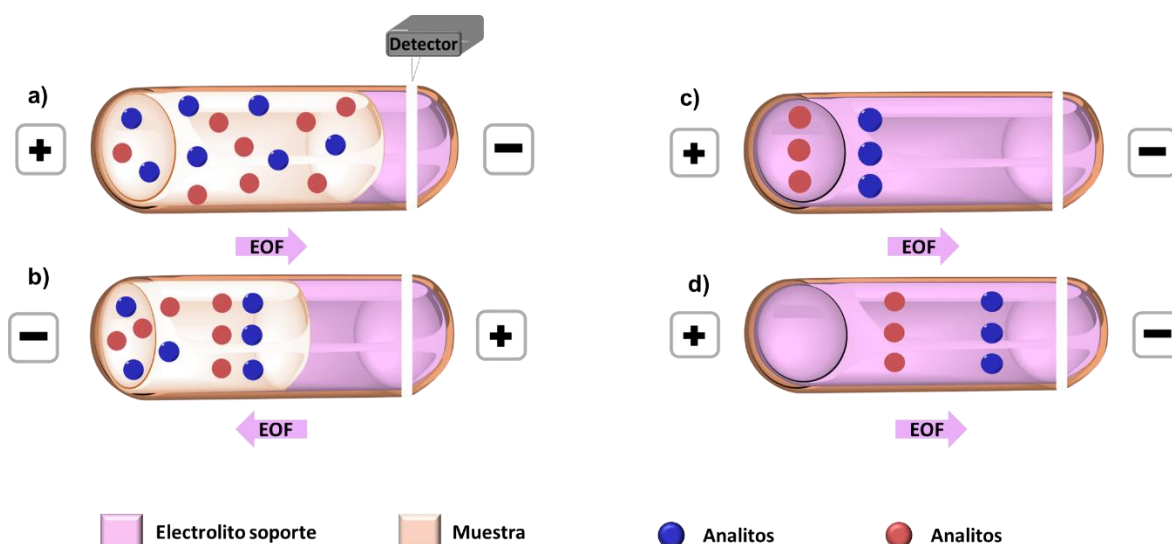


Figura 16. Diagrama de pre-concentración en línea LVSS. a) Inyección de la muestra, b) aplicación del voltaje en polaridad inversa, c) aplicación del voltaje en polaridad normal y d) separación en el sistema electroforético.

Esta técnica presenta varias ventajas como una sensibilidad mejorada ya que permite concentrar los analitos antes de la separación permitiendo una detección de los analitos

a bajas concentraciones; permite un uso eficiente de muestras pequeñas o limitadas; puede mejorar la resolución de la separación lo que es especialmente útil cuando se tienen analitos con perfiles de movilidad parecidos. Es robusto, rápido y económico, a pesar de presentar diversas ventajas no es adecuada para todos los casos y analitos, requiere de una optimización y deben considerarse las limitaciones específicas de la muestra (Chen et al., 2016).

En la *Tabla 9* se enlistan algunos ejemplos donde se realiza la determinación de aditivos alimentarios como: aspartame (ASP), sacarina (SAC), acesulfame-K (ACE), fenilalanina (FEN), tartrazina (TAR), amarillo ocaso (AMA), rojo allura y ciclamato, en muestras complejas de refresco, alimentos y agua potable por electroforesis capilar y sus respectivos LOD.

Tabla 9. Ejemplos de determinación de aditivos alimentarios por electroforesis capilar.

Aditivo	Tipo de muestra	LOD	Referencia
ASP, SAC, ACE y ciclamato	Refresco	1.4 - 4.2 mg L ⁻¹	Bergamo et al., 2011
ASP, SAC, ACE y ciclamato	Alimentos	3.3 - 6.4 mg L ⁻¹	Vistuba et al., 2015
SAC, ACE, FEN, ASP y ciclamato	Agua potable	0.03 - 1.8 mg L ⁻¹	Camargo et al., 2018
TAR, AMA y rojo allura.	Agua potable	21.0 - 41.4 µg L ⁻¹	Flores et al., 2019

El presente trabajo plantea el desarrollo de una técnica electroforética de separación, pre-concentración y determinación simultánea de aditivos alimentarios: edulcorantes (aspartame, acesulfame-K, fenilalanina y sacarina), colorantes (tartrazina y amarillo ocaso) y conservadores (benzoato de sodio) por large volume sample stacking (LVSS) en muestras de agua.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Diseñar una metodología de pre-concentración en línea por large volumen sample stacking en el análisis traza de edulcorantes artificiales, colorantes y aditivos alimenticios en muestras de agua.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de separación en electroforesis capilar de zona de los edulcorantes artificiales fenilalanina (FEN), aspartame (ASP), sacarina (SAC) y acesulfame-K (ACE), aditivos alimenticios como: benzoato de sodio (BEN) y colorantes como: tartrazina (TAR) y Amarillo ocazo (AMA).
- Optimizar el sistema de pre-concentración en línea mediante la aplicación de un diseño de experimentos (DoE).
- Aplicar el método propuesto en muestras de agua de diferente procedencia.

3. Metodología

3.1 Equipos y reactivos

El tetraborato de sodio, ácido pícrico, β -ciclodextrina e hidróxido de sodio fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Los estándares de sacarina (SAC), acesulfame-K (ACE), benzoato de sodio (BEN), aspartame (ASP), fenilalanina (FEN), tartrazina (TAR) y amarillo ocaso (AMA) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Se hizo uso de un potenciómetro (modelo 450; Corning Science Products, NY, USA) con precisión de 0.1 unidades, para el ajuste del pH de la solución del electrolito soporte.

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo Beckman Coulter P/ACE MDQ 5500. Para la separación se utilizó un capilar de sílice fundida (41.7cm x 75 μ m diámetro interno). Cada día de trabajo el capilar se activó mediante la siguiente secuencia: NaOH 1 mol L⁻¹ 15 min., NaOH 0.1 mol L⁻¹ 10 min., agua desionizada 10 min., y finalmente el electrolito soporte 10 min. Entre cada análisis el capilar tenía lavados de la siguiente manera: NaOH 1 mol L⁻¹ 2 min., NaOH 0.1 mol L⁻¹ 1 min., agua desionizada 1 min., y el electrolito soporte 2 min.

Las soluciones estándar utilizadas fueron preparadas mediante diluciones de soluciones madre de aspartame (ASP), fenilalanina (FEN), benzoato de sodio (BEN), sacarina (SAC), acesulfame-K (ACE), tartrazina (TAR), amarillo ocaso (AMA) a concentraciones de 500 y 100 mg L⁻¹; estas soluciones se almacenaron en refrigeración siendo renovadas cada 15 días.

La solución del electrolito soporte consta de tetraborato de sodio 5 mmol L⁻¹ ajustado a pH 10; para el sistema LVSS-CE se añadió al electrolito soporte β -ciclodextrina 0.25 mmol L⁻¹. El ácido pícrico fue utilizado como estándar interno (E.I) en concentraciones de 15 y 5 mg L⁻¹ para CE-UV y LVSS-CE respectivamente.

3.2 Condiciones de análisis para el sistema de CE-UV

La optimización del sistema electroforético (CE-UV) se realizó mediante el método univariable. Para ello se evaluó la composición del electrolito soporte (pH de 8.0 a 10.5,

concentración de 1 a 9 mmol L⁻¹), voltaje de separación (10 a 18 kV) y longitud de onda de 215 nm; el capilar a una temperatura de 25°C y separación en polaridad normal.

3.3 Condiciones de análisis para el sistema de LVSS-CE

LVSS-CE se optimiza mediante un diseño central compuesto (CCD por sus siglas en inglés) en el cual se lleva a cabo 1) selección de variables críticas (tiempo de carga, tiempo de pre-concentración y voltaje de pre-concentración), 2) intervalos de trabajo, 3) obtención de parámetros óptimos y 4) análisis confirmatorio con las condiciones óptimas.

El CCD utiliza un sistema codificado en el cual se tienen tres niveles: bajo, medio y alto representados por (-1, 0, +1) respectivamente; además de incluir puntos axiales denominados (- α y + α) a lo largo de los ejes coordinados de los niveles de factor codificados. Las coordenadas de los puntos axiales de los ejes del factor codificados permiten ampliar la superficie de respuesta a evaluar; los valores correspondientes a los niveles (-1, 0, +1) se codifican de acuerdo con los intervalos de trabajo (Figura 17) mientras que los valores de (- α y + α) se codifican según la siguiente expresión: $\pm\alpha = \sqrt[k]{F}$, donde $F = 2^k$ y k es el número de variables, en este caso $\pm\alpha = 1.68$.

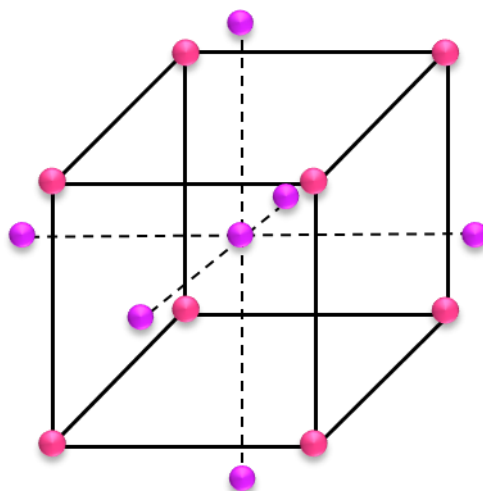


Figura 17. Esquema general del diseño de experimentos central compuesto (CCD).

Para la optimización del sistema LVSS-CE mediante CCD se usan variables decodificadas y (codificadas) y se evalúa: tiempo de carga (min) 1(-1) a 3 (1), tiempo de

pre-concentración (min) de 1(-1) a 3 (1), y voltaje de pre-concentración (kV) 6(-1) a 8 (1).

3.4 Pre-tratamiento de muestra

Cada muestra de agua es previamente filtrada en una de membrana de nylon (Millipore HNWP04700, 47 mm de diámetro, 0.45 micras). De la muestra respectiva se toma 1 mL y se diluye en 10 ml con agua desionizada con E.I. 0.1 mg L^{-1} para su posterior análisis mediante LVSS-CE (*Figura 18*).

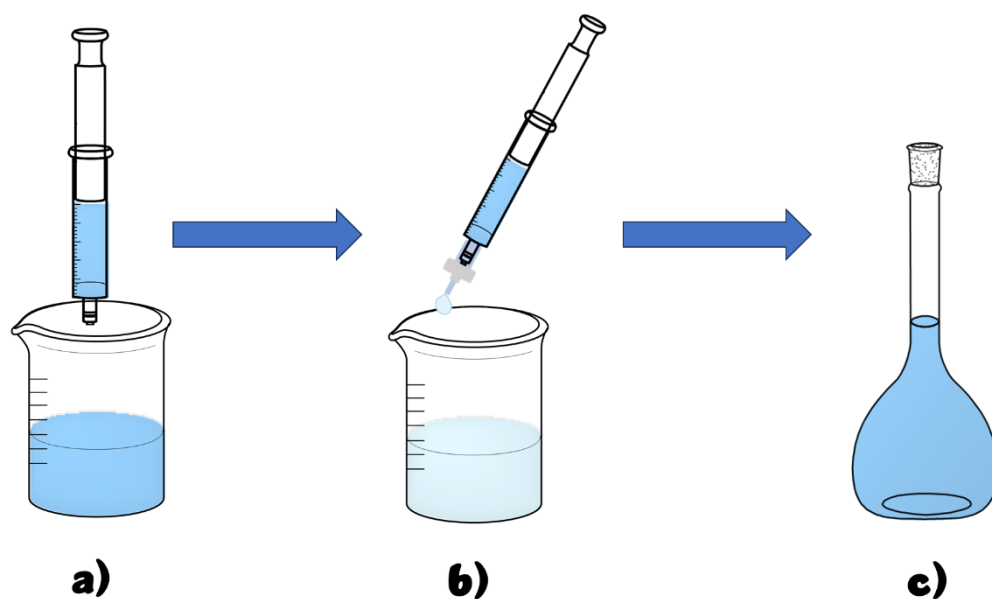


Figura 18. Esquema del pre-tratamiento de muestra: a) Se toman 10 mL de la muestra. b) se filtra la muestra (membrana de nylon), y d) alícuota 1 mL (0.1 mg L^{-1} estándar interno).

4. Resultados y Discusión

4.1 Condiciones de análisis para el sistema de CE-UV

4.1.1 Efecto del pH

Para llevar a cabo la separación por CE es necesario que los analitos estén en forma iónica, por lo que se debe mantener un pH fijo en el electrolito soporte (Camargo et al, 2018). Esto permite que los analitos se encuentren de forma desprotonada, lo que genera una movilidad electroforética dentro del sistema específica para cada analito.

Conforme la naturaleza de los analitos de interés se realizó la evaluación del efecto del pH en un intervalo de 8.0 a 10.5, con una variación de 0.5 entre cada uno (Camargo et al, 2018). Para ello se realizó una solución estándar de los 7 aditivos (ASP, FEN, BEN, SAC, ACE, TAR, AMA) y E.I en una concentración de 10 mg L⁻¹, empleando al tetraborato de sodio como electrolito soporte 5 mmol L⁻¹, con voltaje de separación de 12 kV y longitud de onda (λ) de 215 nm.

La *Figura 19a, 19b y 19c* muestra los electroferogramas correspondientes a pH 8.0, 8.5 y 9.0 donde se observa la inexistencia de señales analíticas características de los analitos de interés, dichos resultados obtenidos se deben a que a valores de pH por debajo de 9.5, los analitos no se encuentran cargados negativamente. Por otro lado, a un pH 9.5 (*Figura 19d*) se observa la obtención de 5 o 6 señales analíticas, conforme los valores de pKa se tiene una parcialidad negativa para algunos analitos de interés, tal es el caso de AMA (pKa= 9.2) y de la FEN (pKa=9.31). A pH=10.0 (*Figura 19e*) se observaron 7 - 8 señales analíticas correspondientes a los aditivos, presentando una separación y resolución analítica adecuada. Por el contrario, a pH=10.5 (*Figura 19f*), se observa que la separación y resolución del sistema no es adecuada a partir de este pH, este efecto se puede observar en la movilidad electroforética. Es por ello que se establece como valor óptimo en los subsecuentes análisis un valor de pH de 10.0 en la separación de aditivos alimentarios.

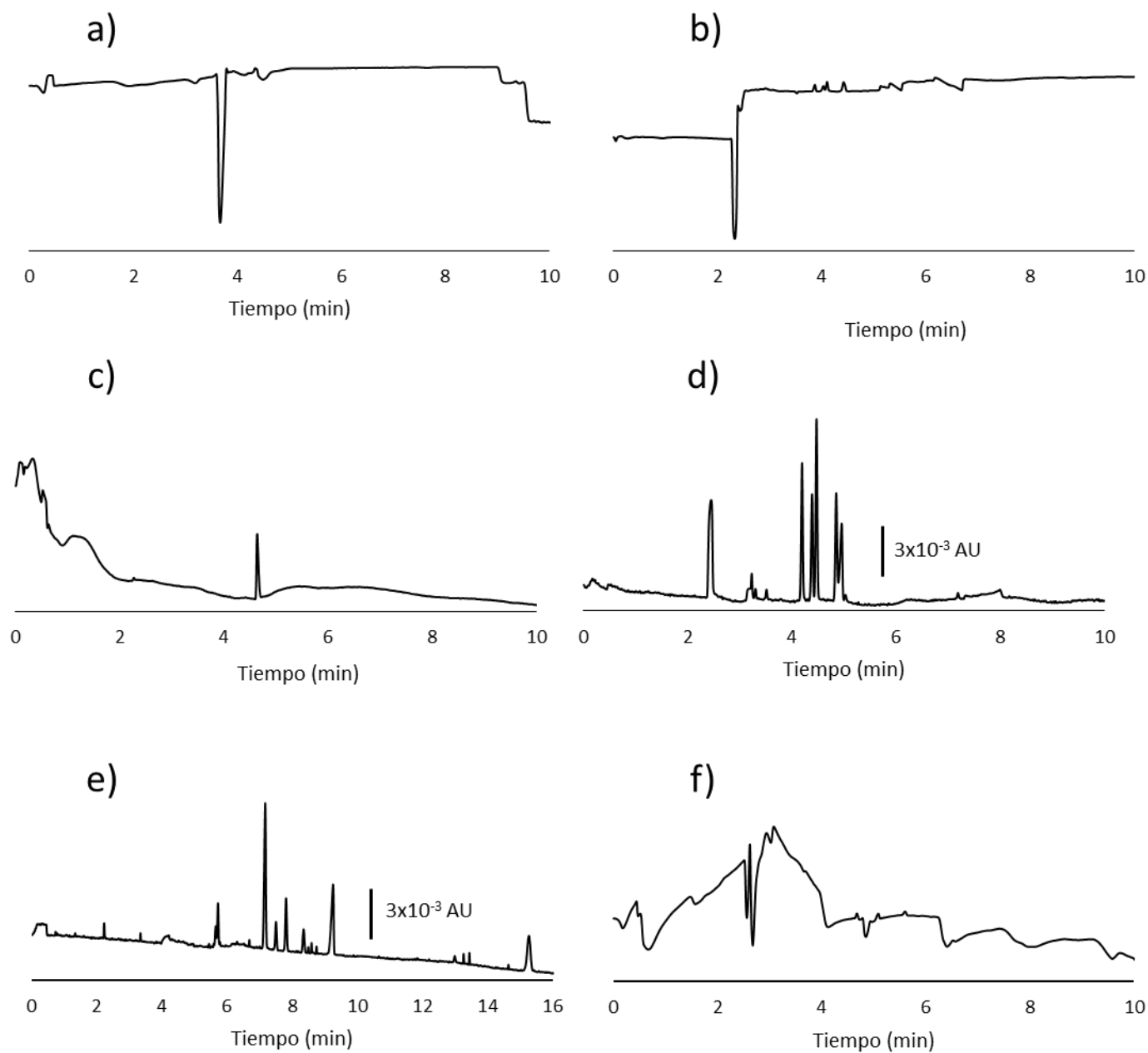


Figura 19. Electroferogramas obtenidos en la evaluación de pH, a) pH=8.0, b) pH=8.5, c) pH=9.0, d) pH=9.5, e) pH=10.0 y f) pH=10.5.

4.1.2 Composición del electrolito soporte

El compuesto seleccionado para preparar el electrolito soporte fue el tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), se evaluó en un intervalo de concentraciones de 1 a 9 mmol L^{-1} , con una variación de 2 unidades entre cada uno. Se analizó una solución estándar que contenía todos los analitos y al E.I. a una concentración de 10 mg L^{-1} , en todos los

casos el electrolito soporte fue a pH=10, a una longitud de onda de 215 nm y 12 kV en voltaje de separación.

En la *Figura 20* se muestran los electroferogramas correspondientes a la separación de los aditivos, en la *Figura 20a* y *20b* se observa que a bajas concentraciones (1 mmol L^{-1} y 3 mmol L^{-1}) de electrolito soporte se tiene una menor corriente eléctrica y por consecuencia el tiempo de migración de cada uno de los aditivos es nulo. Por el contrario, en la *Figura 20d* y *20e* a altas concentraciones de electrolito como 7 mmol L^{-1} y 9 mmol L^{-1} se incrementa la viscosidad disminuyendo la corriente eléctrica y afectando el tiempo de migración de los aditivos; esto ocasiona un aumento en el tiempo de migración del colorante AMA.

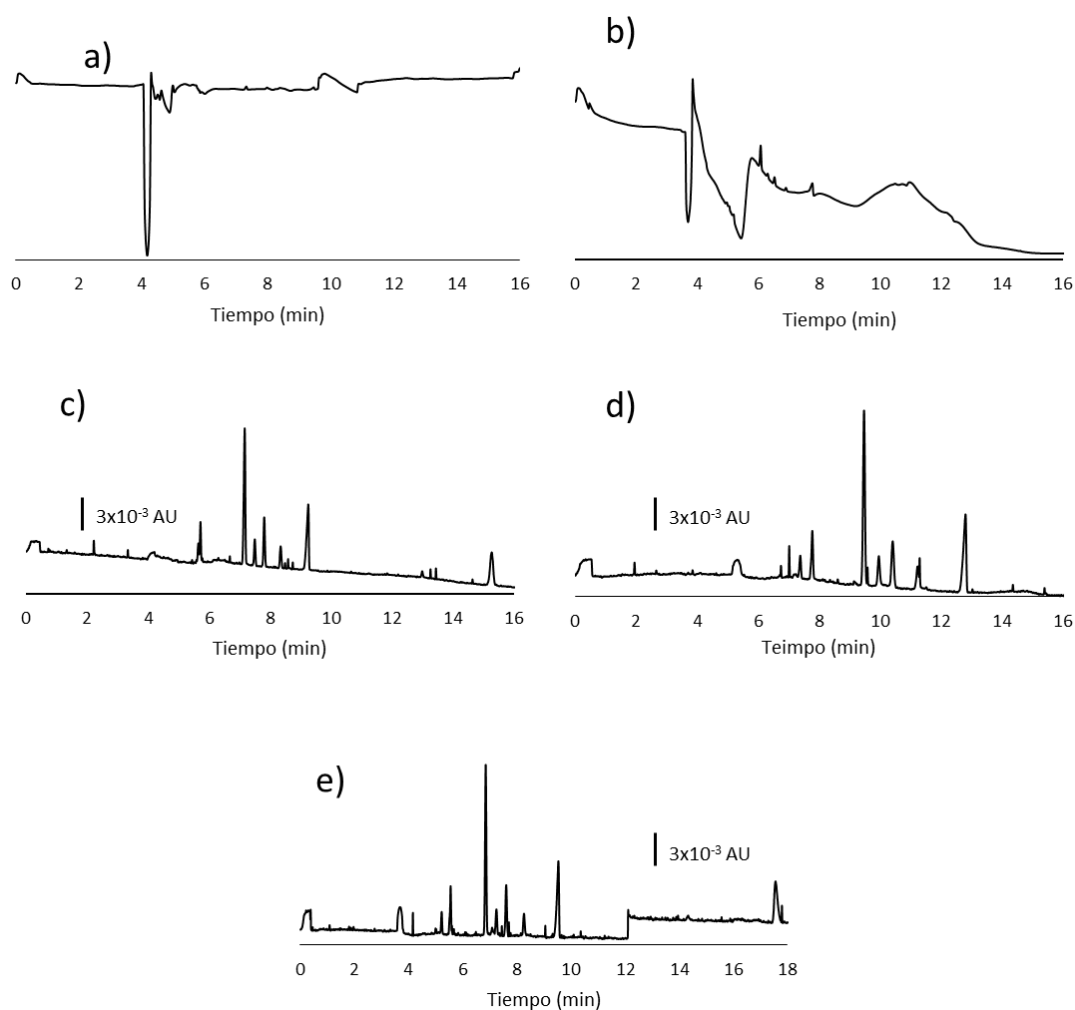


Figura 20. Electroferogramas obtenidos en la evaluación de la composición del electrolito de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; a) 1 mmol L^{-1} , b) 3 mmol L^{-1} , c) 5 mmol L^{-1} , d) 7 mmol L^{-1} y e) 9 mmol L^{-1} .

Es por lo anterior que se tiene un óptimo en 5 mmol L^{-1} (*Figura 20c*), el electroferograma que se observa en la figura 20c se puede observar que se tiene una línea base estable y como la viscosidad del medio es baja el tiempo de migración es menor, obteniendo una resolución y separación adecuada de los aditivos.

4.1.3 Voltaje de separación

Con la concentración y pH del electrolito soporte establecidos se realizó la evaluación del voltaje aplicado durante la separación de los aditivos, permitiendo modificar ya sea el tiempo de migración y/o modificar la eficiencia de la separación analítica. Para ello se preparó una solución de todos los aditivos donde SAC, BEN, ACE, TAR, AMA y E.I estaban a 10 mg L^{-1} , mientras con el objetivo de tener una mayor definición se optó incrementar la concentración de FEN y ASP a 40 mg L^{-1} durante la evaluación del efecto del voltaje en la separación en un intervalo de 10 a 18 kV variando 2 unidades entre cada uno.

Con base en los electroferogramas obtenidos (*Figura 21*), se observó que a menor voltaje aumenta el tiempo de migración de los aditivos como es el caso de 10 kV (*Figura 21a*), disminuyendo la resolución en las dos primeras señales; por otra parte a voltajes de 14, 16 y 18 kV (*Figuras 21c, 21d y 21e*) el tiempo de análisis es menor, sin embargo, no se tiene una buena resolución para la última señal por lo que se decide continuar trabajando con un voltaje en la separación de 12 kV, observando una separación adecuada con un menor tiempo de análisis (*Figura 21b*).

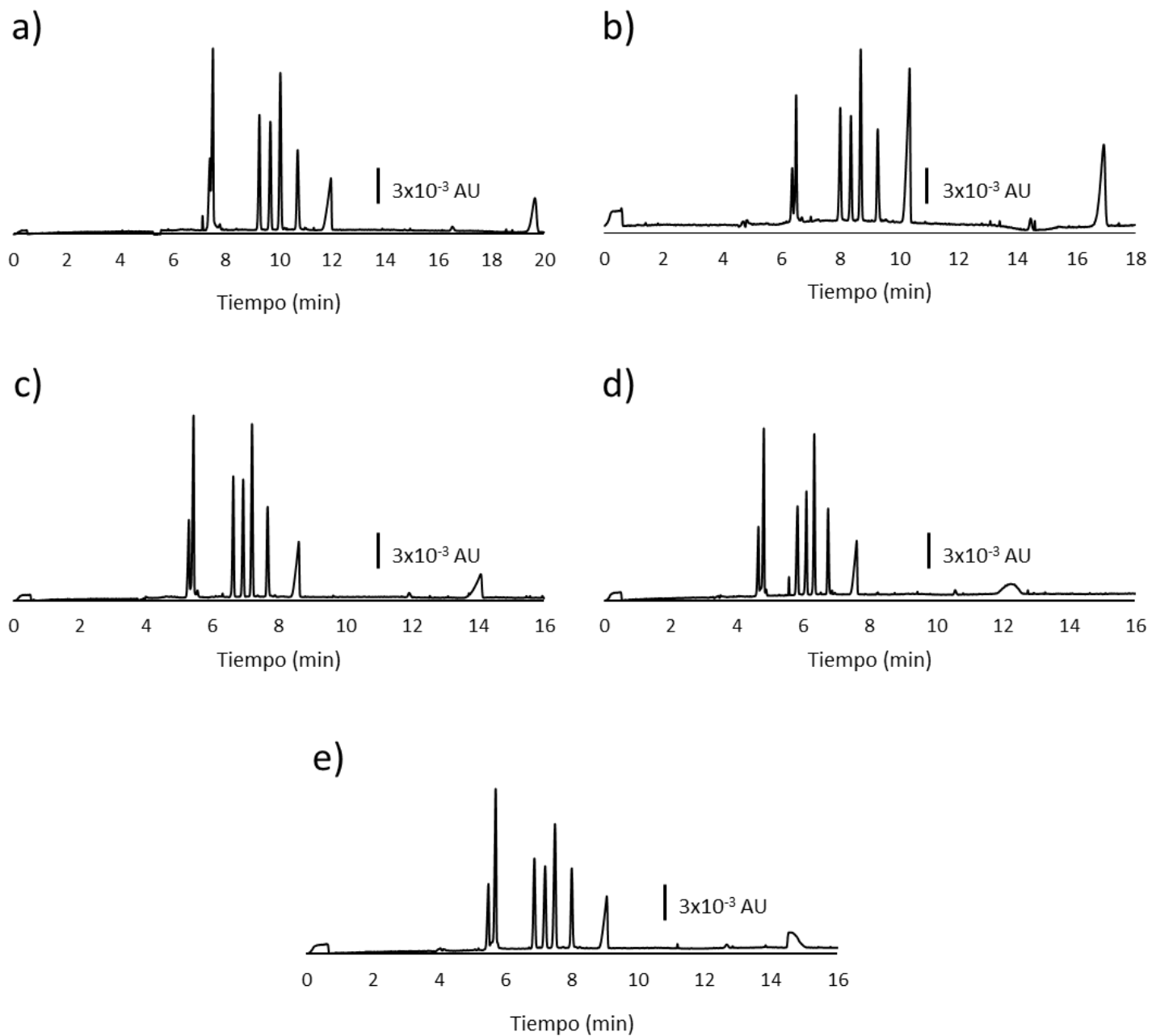


Figura 21. Electroferogramas obtenidos en la evaluación del voltaje de separación. A) 10 kV, b) 12 kV, c) 14 kV, d) 16 kV y e) 18 kV.

4.1.4 Identificación de señales

Teniendo identificadas las señales se observa que cada analito tiene una absorbancia diferente lo que genera señales con intensidades distintas lo que nos lleva a tener diferencias significativas en términos de sensibilidad analítica. Por tal motivo se realiza la identificación de cada señal previa a la optimización del método mediante el análisis soluciones individuales de cada uno de los aditivos y el E.I en concentraciones conocidas, permitiendo la identificación con sus respectivos tiempos de migración. Una vez identificada cada una de las señales se preparó una solución que contenía los siete aditivos y E.I bajo las siguientes condiciones: Electrolito soporte 5 mmol L⁻¹, ajustado a pH 10, voltaje de separación 12 kV y longitud de onda a 215 nm (*Figura 22*). Por lo que se establece una relación de concentraciones de 1:3, donde la relación se da de la siguiente manera 1: SAC, BEN y ACE y 3: FEN, ASP, TAR y AMA respectivamente.

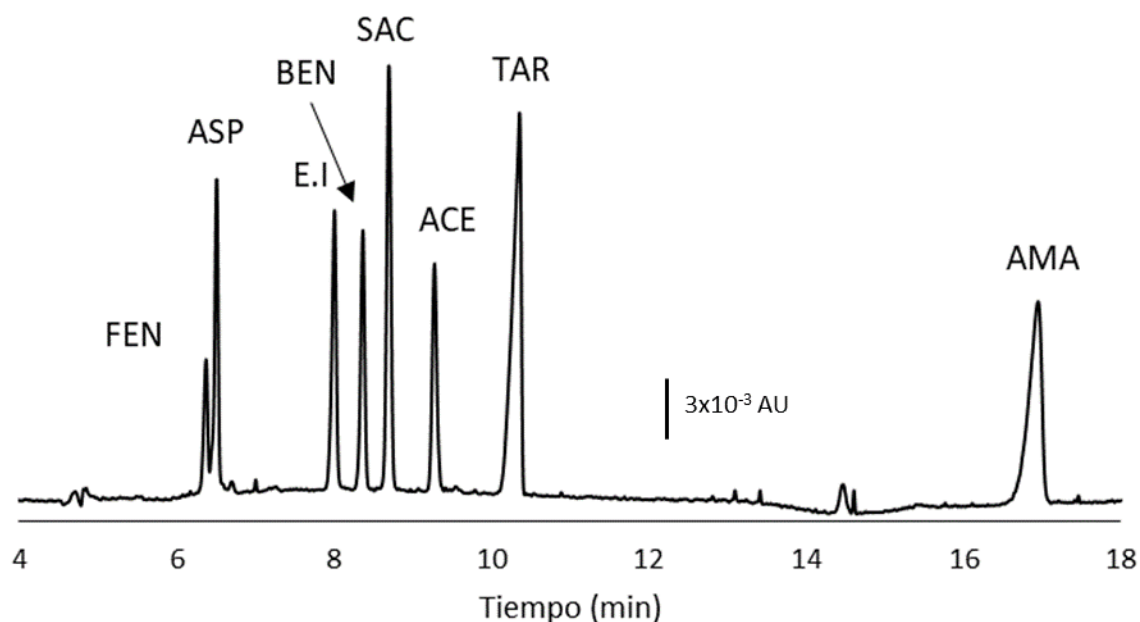


Figura 22. Electroferograma obtenido al análisis de una solución de 15 mg L⁻¹ de E.I (ácido pícrico); SAC, BEN y ACE 30 mg L⁻¹; FEN, ASP, TAR y AMA 90 mg L⁻¹. Analizado a 12 kV y 215 nm.

Debido a la baja concentración a la que pueden encontrarse los residuos de aditivos alimentarios en muestras de agua (mg L⁻¹ y µg L⁻¹), se propuso una metodología de pre-

concentración en línea denominada Large volume sample stacking mediante electroforesis capilar (LVSS-CE).

4.2 Optimización del sistema de LVSS-CE

En una primera aproximación de CE-UV a LVSS-CE se obtuvieron los siguientes electroferogramas (*Figura 23*) donde a) es el electroferograma correspondiente al sistema CE-UV obtenido del análisis de una solución de 15 mg L⁻¹ de E.I (ácido pícrico); SAC, BEN y ACE 30 mg L⁻¹; FEN, ASP, TAR y AMA 90 mg L⁻¹. Analizado a 12 kV y 215 nm. Mientras que b) corresponde al sistema LVSS-CE donde se manejó un tiempo de carga de 3 min., un tiempo de pre-concentración 3 min., y un voltaje de pre-concentración de 6 kV; 5 mg L⁻¹ de E.I (ácido pícrico); SAC, BEN y ACE 1 mg L⁻¹; FEN, ASP, TAR y AMA 2.5 mg L⁻¹.

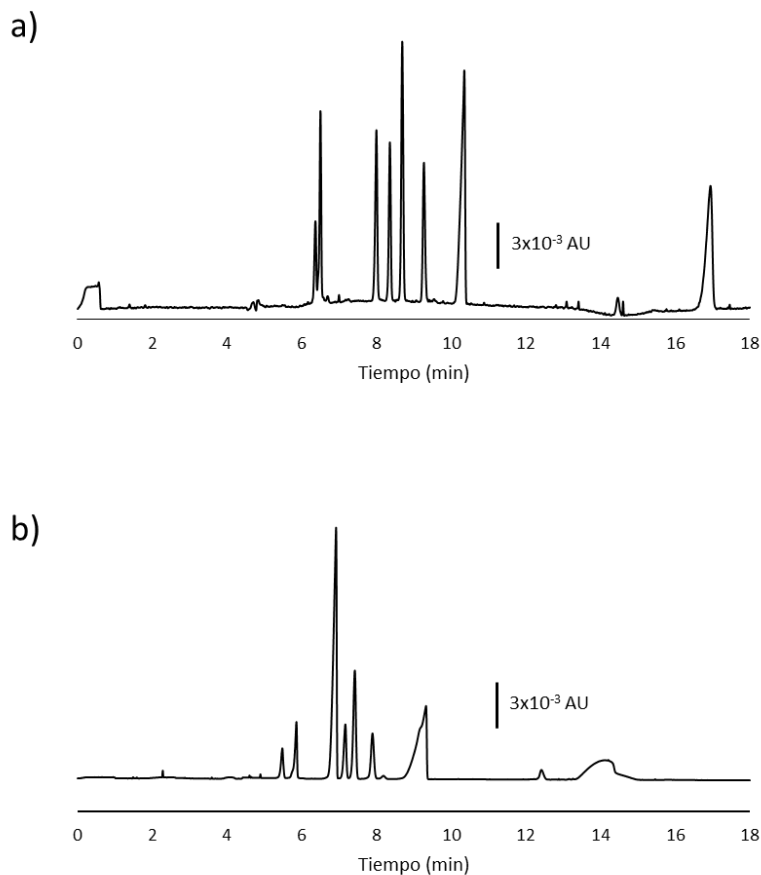


Figura 23. Electroferogramas correspondientes a: a) sistema CE-UV y b) sistema LVSS-CE.

Sin embargo, tal y como se observa en la *Figura 24 b)* se observa una afectación en la resolución analítica para el caso de TAR y AMA. Con el objetivo de minimizar este efecto, se planteó el uso de la β -ciclodextrina para modificar las propiedades ácido-base de los analitos de interés. Para ello la β -ciclodextrina se evalúa en un intervalo de concentración de 0.1 a 0.75 mmol L⁻¹ como parte de la solución electrolito.

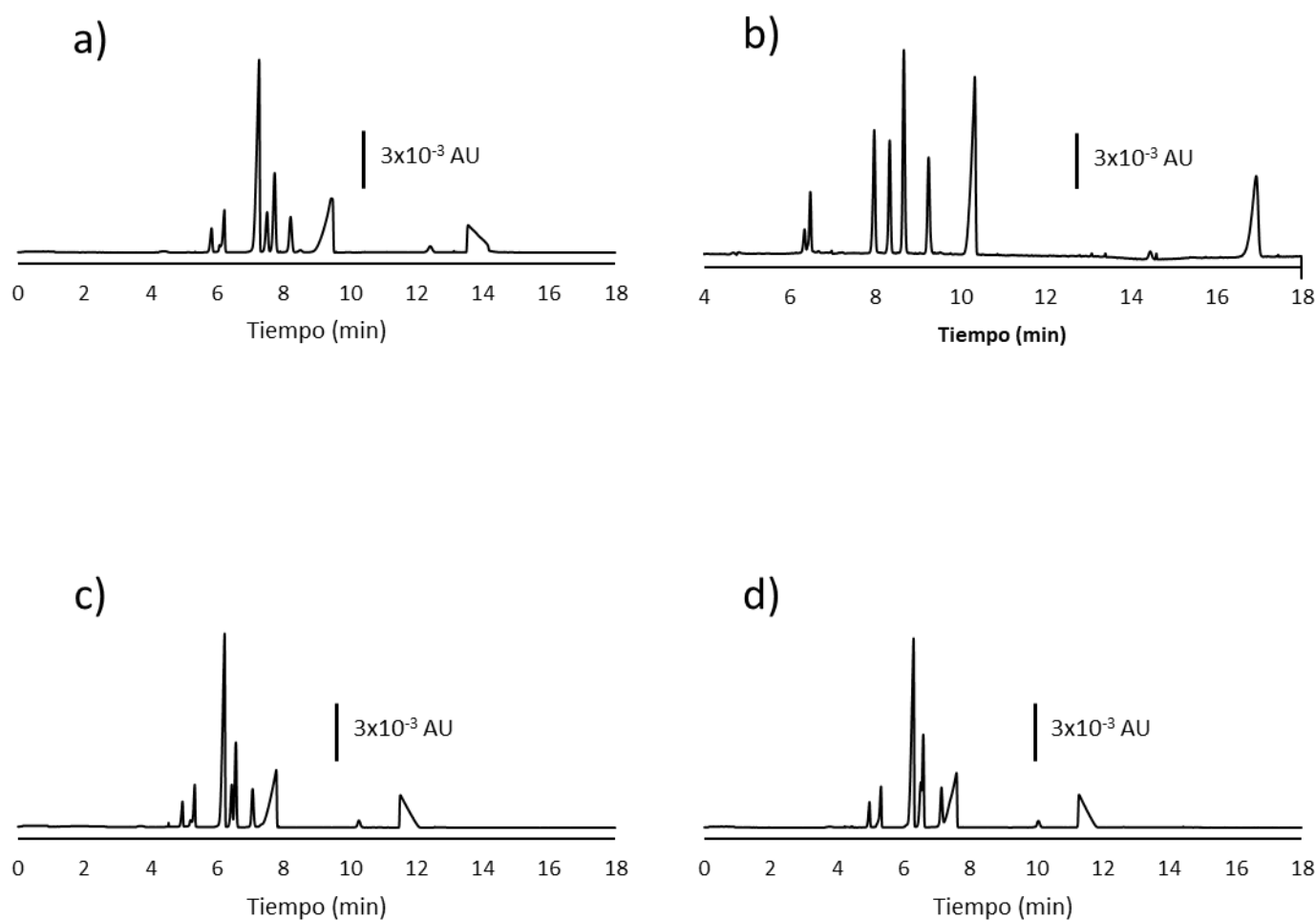


Figura 24. Electroferogramas obtenidos en la evaluación de la concentración de β -ciclodextrina. A) 0.10 mmol L⁻¹, b) 0.25 mmol L⁻¹, c) 0.50 mmol L⁻¹ y d) 0.75 mmol L⁻¹.

En la *Figura 24* podemos observar los electroferogramas obtenidos en la evaluación de la concentración de β -ciclodextrina. En los electroferogramas, la presencia de β -ciclodextrina en la solución electrolito modifica la movilidad electroforética de los analitos de interés (Mena et al., 2003). Sin embargo, con una concentración 0.1 mmol L⁻¹ de β -ciclodextrina (*Figura 24a*) se observa que la señal correspondiente al amarillo

ocaso (AMA) no se ve afectada en ningún sentido, por lo que permanece un ensanchamiento que afecta su resolución. Mientras que para una concentración de 0.25 mmol L⁻¹ se observa en la *Figura 24b* una adecuada separación para todos los analitos de interés con una buena resolución. Por otro lado, a concentraciones superiores a 0.50 las señales de SAC y BEN se traslapan entre sí, caso similar ocurre a una concentración de 0.75 mmol L⁻¹ (*Figura 24d*) para el caso del acesulfame-K (ACE) y tartrazina (TAR). Por lo tanto, selecciona una concentración óptima de β-ciclodextrina de 0.25 mmol L⁻¹ en los subsecuentes análisis permitiendo una buena separación y resolución para todas las señales.

Por otro lado, de acuerdo con el fundamento de la técnica LVSS es necesaria la evaluación de las variables críticas para asegurar la efectividad de la técnica como: el tiempo de carga, el voltaje aplicado y el tiempo de pre-concentración. Para ello, mediante un diseño univariable, estableciendo las siguientes variables: tiempo de carga (1 a 4 min), tiempo de pre-concentración (1 a 4 min) y voltaje de pre-concentración (3 a 10 kV) para así poder dilucidar las posibles combinaciones en función del factor de enriquecimiento.

Bajo los niveles mencionados anteriormente en el apartado 3.3 condiciones de análisis para el sistema de LVSS-CE, se obtiene una serie de 20 experimentos estableciendo los siguientes factores: A (tiempo de carga; min), B (tiempo de pre-concentración, min) y C (voltaje de pre-concentración, kV). Los experimentos fueron realizados de manera aleatoria analizando una solución estándar de todos los analitos (relación 1:3 mg L⁻¹) y E.I. a 5 mg L⁻¹. El factor de enriquecimiento fue determinado para cada uno de los analitos conforme las áreas obtenidas para los sistemas CE-UV y LVSS-CE respectivamente. Por otro lado, la variable de salida se estableció como el cociente del promedio y la desviación estándar de las áreas obtenidas de los experimentos (*Tabla 10*).

Los resultados fueron analizados estadísticamente para ajustar cada variable a su óptimo con la menor variabilidad posible. Todos los cálculos se hicieron mediante MINITAB V17.1 software. La validación del modelo se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) obtenido y al análisis de los datos (*Tabla 11*), los datos experimentales se ajustaron al modelo cuadrático al 87.43 % de la varianza.

Tabla 11. Valores de ANOVA para el sistema LVSS-CE; donde A es el tiempo de carga, B el tiempo de pre-concentración y C el voltaje de pre-concentración.

Origen	DF	Adj SS	Adj MS	Valor-F	Valor-P
Modelo	9	71.73	7.97	7.73	0.002
Lineal	3	8.22	2.74	2.66	0.105
A	1	0.01	0.01	0.01	0.920
B	1	0.50	0.50	0.49	0.501
C	1	7.71	7.71	7.48	0.021
Cuadrático	3	14.04	4.68	4.54	0.030
A*A	1	1.36	1.36	1.32	0.277
B*B	1	1.36	1.36	1.32	0.277
C*C	1	9.99	9.99	9.69	0.011
Interacción de 2-vías	3	49.46	16.49	15.99	0.000
A*B	1	23.11	23.11	22.42	0.001
A*C	1	13.17	13.17	12.78	0.005
B*C	1	13.17	13.17	12.78	0.005
Error	10	10.31	1.03	-	-
Ajuste	5	10.31	2.06	8249.9	0.000
Error puro	5	0.001	0.0002	-	-
Total	19	82.03	-	-	-

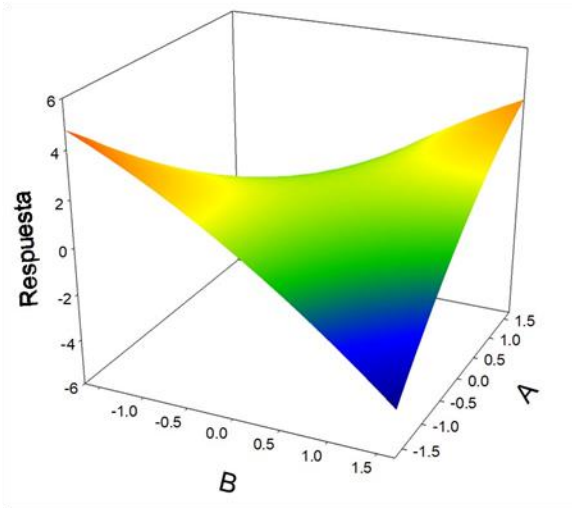
Con los datos estadísticos de la tabla anterior, se determina la influencia de cada variable en el sistema de pre-concentración por LVSS. De acuerdo con el valor-P ($P < 0.05$) el sistema se ajusta al modelo cuadrático, mientras que la interacción entre las variables A*B tienen una mayor repercusión en el sistema. Sin embargo, durante el desarrollo del sistema se determina que las variables en su conjunto (ABC) son críticas en el sistema LVSS-CE. La ecuación de la superficie de respuesta se obtuvo mediante las variables codificadas, teniendo la siguiente expresión:

$$Y_1 = 1.432 + 0.028 A - 0.192 B - 0.751 C - 0.307 A * A - 0.307 B * B + 0.832 C * C \\ + 1.700 A * B - 1.283 A * C - 1.283 B * C$$

Donde Y es la respuesta (cociente del promedio y la desviación estándar de las áreas), A es el tiempo de carga (min), B es tiempo de pre-concentración (min) y C es voltaje de pre-concentración (kV). Los gráficos de superficie muestran la dependencia de las variables críticas de pre-concentración LVSS-CE (*Figura 25*). En la *Figura 25 a)* muestra la evaluación del tiempo de carga / tiempo de pre-concentración (A , B), a mayor tiempo de carga mayor cantidad de analitos y por tanto mayor factor de enriquecimiento. Sin embargo, si el tiempo de carga supera un (98.0%) del volumen del capilar, se produce una disminución y/o pérdida de la fuerza iónica afectando la pre-concentración. La *Figura 25 b)* muestra la interacción entre el tiempo de carga / voltaje de pre-concentración (A , C). El factor de enriquecimiento aumenta o disminuye en función del tiempo de carga, mientras que el voltaje de pre-concentración repercute de forma directa en la movilidad de los analitos, por lo que a menor voltaje menor factor de pre-concentración, mientras que a un voltaje elevado se puede obtener el mayor factor de enriquecimiento o en su defecto la pérdida de los analitos. *Figura 25 c)* muestra la interacción entre el tiempo de pre-concentración / voltaje de pre-concentración (B , C), conforme los resultados obtenidos, se observa que existe una dependencia entre dichas variables mediante la obtención de los siguientes sistemas: a) nivel bajo (tiempo / voltaje de pre-concentración) menor factor de enriquecimiento, b) nivel bajo tiempo de pre-concentración, nivel alto voltaje de pre-concentración, mayor factor de enriquecimiento, c) nivel alto (tiempo / voltaje de pre-concentración, se ocasiona la pérdida de los analitos de interés, d) nivel alto tiempo de pre-concentración, nivel bajo voltaje, se tiene un factor de enriquecimiento significativo en todos los analitos.

Gráfico de superficie: Respuesta vs A,B

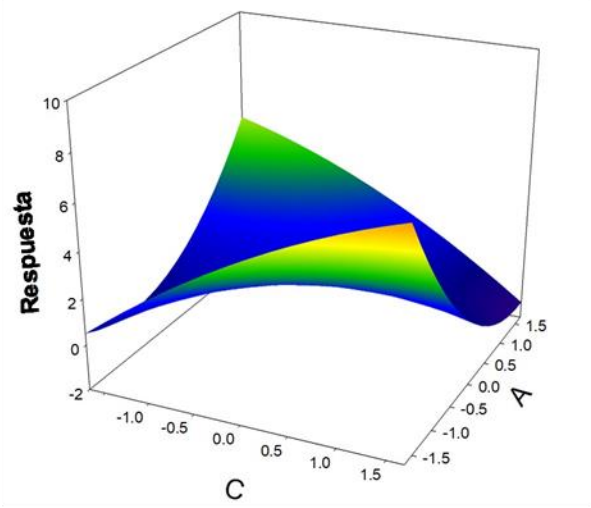
C=0



a)

Gráfico de superficie: Respuesta vs A,C

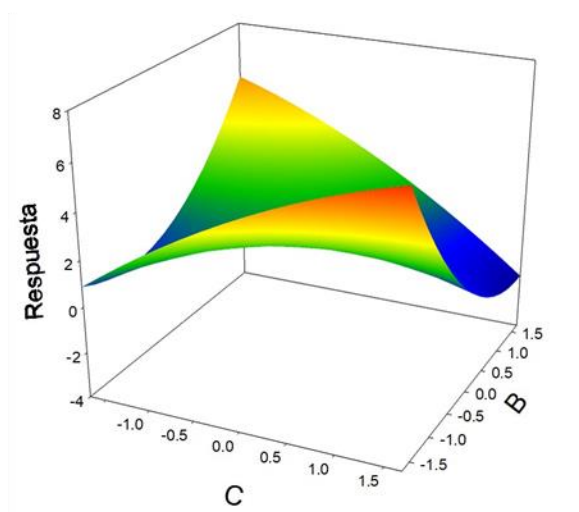
B=0



b)

Gráfico de superficie: Respuesta vs B,C

A=0



c)

A: tiempo de carga
B: tiempo de pre-concentración
C: voltaje de pre-concentración

Figura 25. Gráficos de superficie de las interacciones de dos vías para las variables: A: tiempo de carga, B: tiempo de pre-concentración y C: voltaje de pre-concentración.

A partir de la expresión puede deducirse que las tres variables evaluadas ejercen una influencia en la respuesta. Las condiciones óptimas seleccionadas a partir de las superficies de respuesta fueron: A = 1.68, B = 1.68 y C = -1.68, correspondiente a (A) 3.7 min., tiempo de carga, (B) 3.7 min., tiempo de pre-concentración y (C) 5.5 kV., voltaje de pre-concentración (Figura 26).

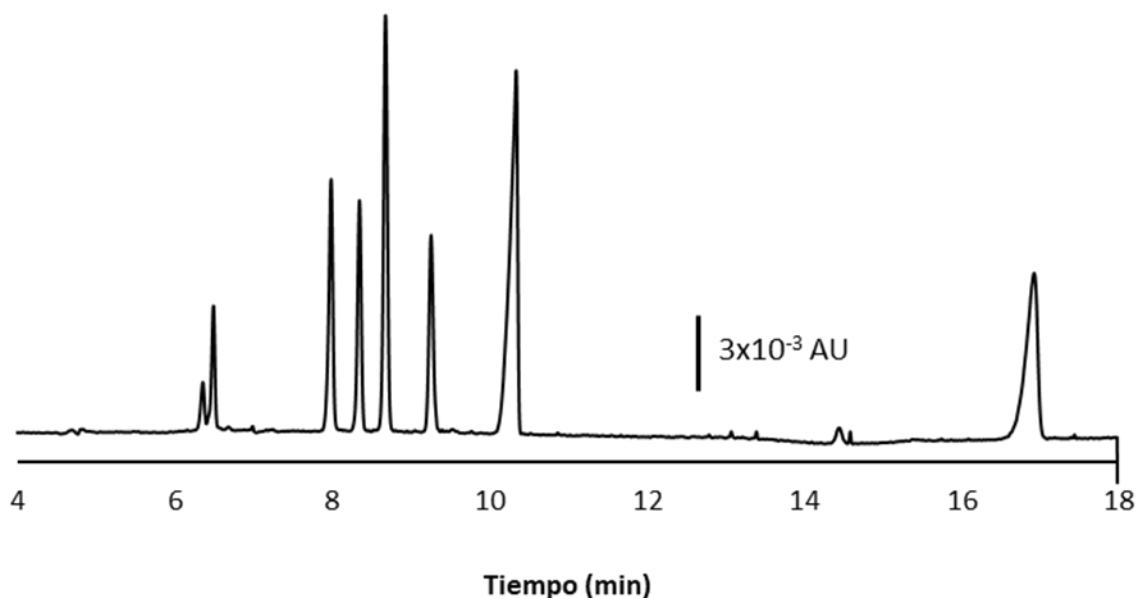


Figura 26. Electroferograma obtenido por el método LVSS-CE bajo las condiciones óptimas para el análisis de una solución de 5 mg L^{-1} de E.I (ácido pícrico); SAC, BEN y ACE 1 mg L^{-1} ; FEN, ASP, TAR y AMA 3 mg L^{-1} . Analizado a 12 kV y 215 nm.

4.3 Obtención de parámetros analíticos

Para el sistema CE-UV se construyó la curva de calibrado bajo las siguientes condiciones: relación 1:3 respecto a las concentraciones (SAC, BEN, ACE): (FEN, ASP, TAR, AMA); con concentraciones de hasta 15 mg L^{-1} , con una concentración constante del E.I en 15 mg L^{-1} . Mientras que para el sistema LVSS-CE se planteó una curva de calibrado bajo las condiciones óptimas en un intervalo de hasta 2.7 mg L^{-1} con una concentración constante del E.I en 0.1 mg L^{-1} .

Los resultados obtenidos de ambos sistemas se muestran en la *Tabla 12*. Las áreas de los picos obtenidos en unidades arbitrarias (A.U.) fueron medidas a partir de las relaciones de área. Los Límites de Detección (LOD por sus siglas en inglés) se determinaron mediante la relación señal/ruido igual a 3.29 y los Límites de Cuantificación (LOQ por sus siglas en inglés), considerado que debe tener un valor 3 veces mayor que LOD, conforme las recomendaciones de IUPAC (IUPAC, 1995).

Tabla 12. Parámetros analíticos para los sistemas CE-UV y LVSS-CE.

Parámetros analíticos para el sistema CE-UV						
Aditivos	Pendiente (b_1)	Ordenada (b_0)	r^2	Intervalo lineal (mg L^{-1})	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
FEN	0.0139 ± 0.0003	0.0006 ± 0.0032	0.998	1.02 – 15	1.02	3.05
ASP	0.0294 ± 0.0006	-0.0021 ± 0.0069	0.998	1.03 – 15	1.03	3.09
BEN	0.0644 ± 0.0012	-0.0117 ± 0.0104	0.997	0.88 – 13.75	0.88	2.64
SAC	0.1057 ± 0.0017	0.0012 ± 0.0140	0.998	0.72 – 13.75	0.72	2.17
ACE	0.0633 ± 0.0014	-0.005 ± 0.0116	0.996	1.01 – 13.75	1.01	3.02
TAR	0.0725 ± 0.0011	0.0329 ± 0.0231	0.998	1.75 – 15	1.75	5.24
AMA	0.0558 ± 0.0017	0.0466 ± 0.0348	0.993	3.42 – 15	3.42	10.25

Parámetros analíticos para el sistema LVSS-CE						
Aditivos	Pendiente (b_1)	Ordenada (b_0)	r^2	Intervalo lineal (mg L^{-1})	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
FEN	1.0804 ± 0.0294	0.0302 ± 0.0366	0.993	0.28 – 2.7	0.28	0.85
ASP	2.0207 ± 0.0373	0.0321 ± 0.0464	0.997	0.16 – 2.7	0.16	0.49
BEN	7.6666 ± 0.1543	0.0367 ± 0.0198	0.998	0.01 – 0.9	0.01	0.05
SAC	17.023 ± 0.1609	0.0843 ± 0.0668	0.998	0.03 – 0.9	0.03	0.1
ACE	8.1592 ± 0.0727	0.0292 ± 0.0302	0.999	0.03 – 0.9	0.03	0.1
TAR	11.7225 ± 0.0968	0.2341 ± 0.1252	0.999	0.25 – 2.7	0.08	0.25
AMA	2.8218 ± 1.3002	2.0703 ± 1.6187	0.997	0.12 – 2.25	0.12	0.37

Para evaluar la precisión y exactitud se realizaron pruebas de repetitividad y reproducibilidad evaluados a dos niveles de concentración y por triplicado de análisis, donde a y A son concentraciones para SAC, BEN y ACE; b y B concentraciones para FEN, ASP, TAR y AMA. Se calculó la desviación estándar relativa (%DER) $\leq 10\%$ en todos los casos, tal y como se muestra en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Repetitividad y reproducibilidad para los sistemas CE-UV y LVSS-CE.

Aditivos	Sistema CE-UV				Sistema LVSS-CE			
	%DER		%DER		%DER		%DER	
	Repetitividad		Reproducibilidad		Repetitividad		Reproducibilidad	
FEN	^b 1.68	^B 2.33	^b 6.79	^B 4.14	^b 1.68	^B 2.33	^b 3.81	^B 4.62
ASP	^b 3.71	^B 1.21	^b 7.73	^B 8.73	^b 3.71	^B 1.21	^b 6.61	^B 4.93
BEN	^a 1.72	^A 1.36	^a 2.45	^A 3.27	^a 1.72	^A 1.36	^a 4.38	^A 4.04
SAC	^a 1.30	^A 1.34	^a 1.82	^A 4.55	^a 1.30	^A 1.34	^a 3.06	^A 3.19
ACE	^a 1.80	^A 1.59	^a 4.87	^A 5.54	^a 1.80	^A 0.59	^a 3.52	^A 3.06
TAR	^b 3.56	^B 1.81	^b 4.31	^B 5.61	^b 3.56	^B 0.81	^b 5.79	^B 4.94
AMA	^b 1.38	^B 6.52	^b 4.87	^B 7.44	^b 1.38	^B 6.52	^b 7.59	^B 7.74
	a: 2.5 mg L ⁻¹		A: 7.5 mg L ⁻¹		a: 0.075 mg L ⁻¹		A: 0.450 mg L ⁻¹	
	b: 7.5 mg L ⁻¹		B: 22.5 mg L ⁻¹		b: 0.225 mg L ⁻¹		B: 1.350 mg L ⁻¹	

4.4 Comparación de los sistemas: CE-UV vs LVSS-CE

A partir de las curvas de calibrado de ambos sistemas, se calcularon los factores de enriquecimiento aportados por la técnica de pre-concentración en función de los LOD como el cociente de LOD del sistema CE-UV y LOD del sistema LVSS-CE para cada aditivo. La *Tabla 14* muestra los factores de enriquecimiento obteniendo valores en un intervalo de 3.64 hasta 88.00.

Tabla 14. Factores de enriquecimiento para cada aditivo.

Aditivos	Factor de enriquecimiento
FEN	3.64
ASP	6.43
BEN	88.00
SAC	24.00
ACE	33.66
TAR	21.87
AMA	28.50

En la *Figura 27* podemos observar la comparación de los electroferogramas obtenidos para cada sistema CE-UV vs LVSS-CE. a) pertenece al sistema LVSS-CE y b) al sistema CE-UV, para ambos sistemas los analitos se encuentran a una relación de concentraciones 1:3 mg L⁻¹ (SAC, BEN, ACE: FEN, ASP, TAR, AMA) y E.I. a 5 mg L⁻¹.

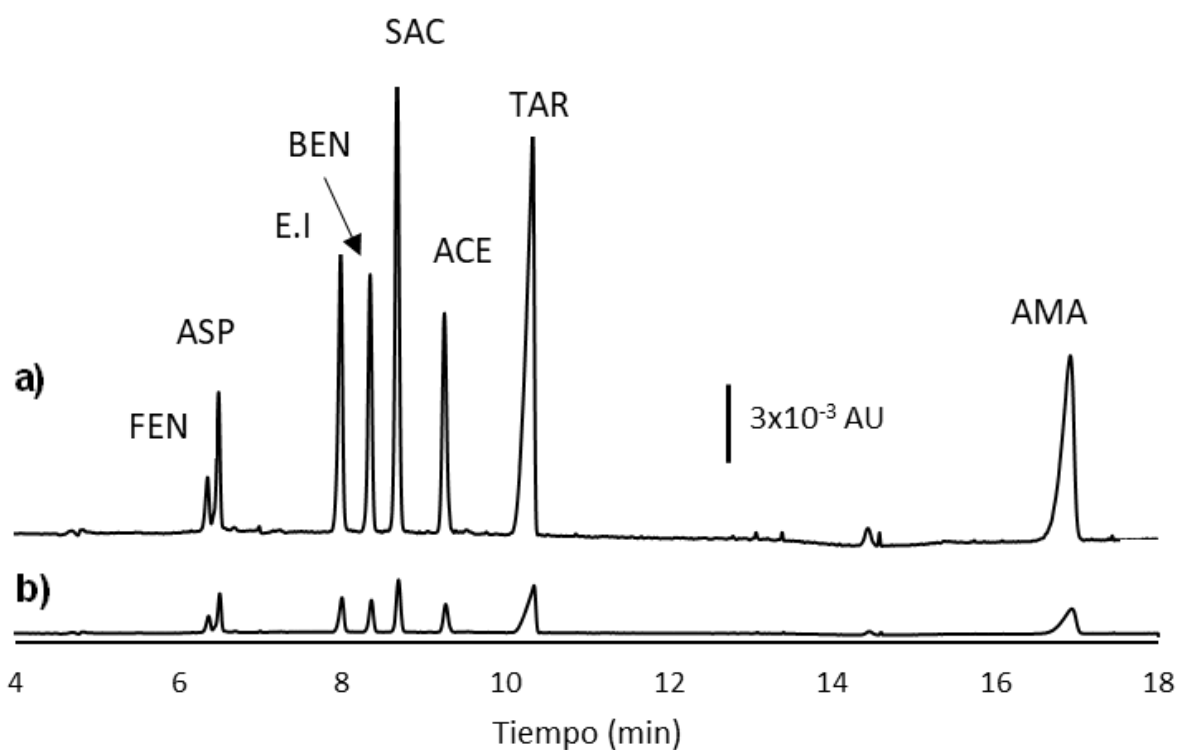


Figura 27. Electroferogramas correspondientes a: a) sistema LVSS-CE y b) sistema CE-UV. Analizado a 12 kV y 215 nm; para ambos sistemas los analitos se encuentran a una relación de concentraciones 1:3 mg L⁻¹ (SAC, BEN, ACE: FEN, ASP, TAR, AMA) y E.I. a 5 mg L⁻¹.

4.5 Aplicación en muestras reales

Con la metodología de pre-concentración LVSS-CE optimizada se empleó en el análisis de 12 muestras reales de agua de diferente procedencia: agua de grifo de diferentes municipios del estado de Hidalgo, agua preenvasada y agua de manantial, de las cuales 4 fueron agua preenvasada, 5 fueron agua de grifo y 3 de manantial.

Cada muestra de agua fue previamente filtrada en una de membrana de nylon; se realizó un análisis por triplicado de cada muestra y para tener un análisis confirmatorio sobre la señal analítica correspondiente se añadió sobre la muestra una concentración conocida del presunto analito; las concentraciones se calcularon haciendo una interpolación en la curva de calibrado del sistema LVSS-CE.

En la *Figura 28* podemos observar el electroferograma corresponde a una muestra positiva de agua de grifo para BEN, analizadas bajo las condiciones óptimas.

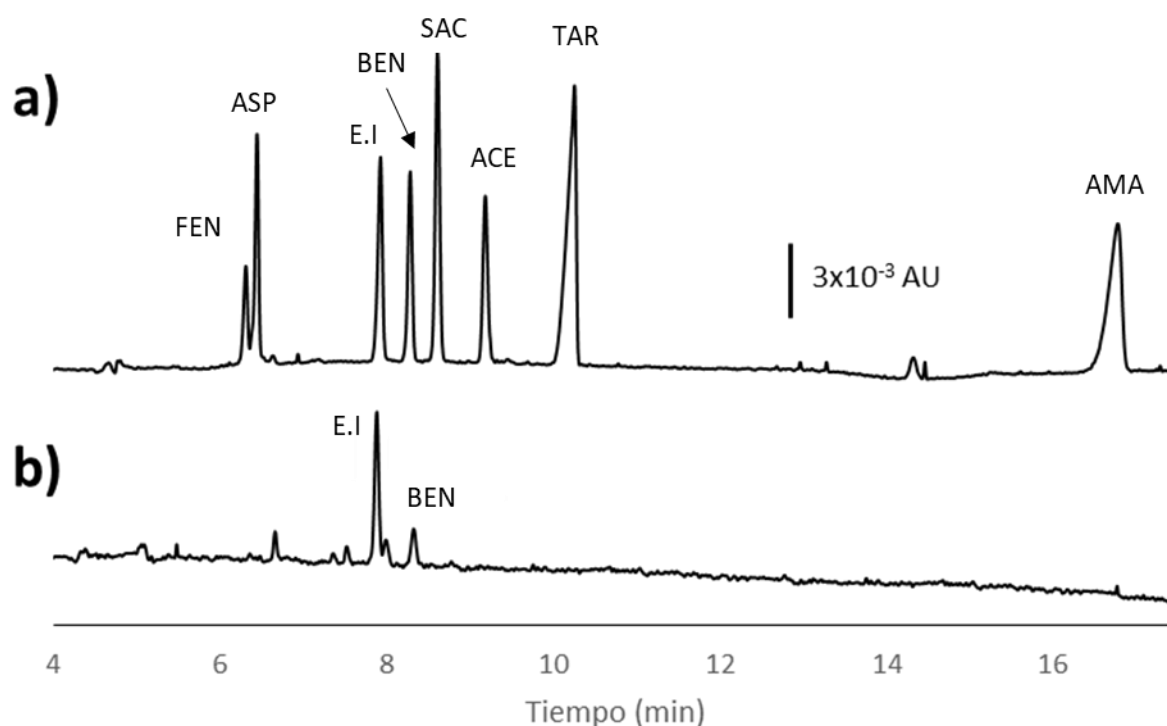


Figura 28. Electroferograma corresponde a una muestra positiva para BEN, ambas analizadas bajo las condiciones óptimas. a) estándar donde SAC, BEN y ACE están a 0.15 mg L^{-1} , FEN, ASP, TAR y AMA a 0.45 mg L^{-1} y E.I. a 0.1 mg L^{-1} . b) muestra con E.I. a 0.1 mg L^{-1} .

De las 12 muestras analizadas solo 3 de ellas, dos correspondientes a agua preenvasada y una correspondiente a agua de manantial, fueron positivas para BEN y TAR respectivamente (*Tabla 15*).

Tabla 15. Concentraciones de las muestras reales positivas.

Muestra	BEN (mg L ⁻¹)	TAR (mg L ⁻¹)
Preenvasada	0.028	-
Manantial	-	0.129
Preenvasada	-	0.618

Otros estudios para la determinación de conservadores, edulcorantes y colorantes son los que se presentan en la tabla siguiente (*Tabla 16*):

Tabla 16. Comparación de metodologías en la determinación de edulcorantes, conservadores y colorantes.

Aditivo	Metodología	LOD	Referencia
ACE, ASP, ciclamato, sucralosa	HPLC	0.001-0.04 µg L ⁻¹	Arbeláez et al., 2015
SAC	Valoración potenciométrica	2.5 mg L ⁻¹	Carlioni et al., 2003
AMA, TAR, rojo allura, azul brillante	Espectroscopia UV-Vis	0.10-0.29 mg L ⁻¹	Rodríguez et al., 2013
TAR	HPLC	0.51-0.62 mg L ⁻¹	Pacheco, 2018
ACE, SAC, ASP	CE-UV	0.01-1.0 mg L ⁻¹	Frazier et al., 2000
ACE, SAC, ASP, cafeína	HPLC	4-30 mg L ⁻¹	Chen & Wang, 2001
SAC, BEN, ACE, TAR, AMA, FEN, ASP	CE-UV	0.72-3.42 mg L ⁻¹	Presente trabajo
SAC, BEN, ACE, TAR, AMA, FEN, ASP	LVSS-CE	10-280 µg L ⁻¹	Presente trabajo

Los límites de detección obtenidos en la metodología propuesta de pre-concentración es LVSS-CE competitiva respecto a los mostrados en la tabla anterior obtenidos por otras metodologías, además de ser un análisis multianalito de aditivos alimentarios, con un bajo consumo de muestra y que permiten la determinación de concentraciones traza de los mismos.

5. Conclusiones

- Las condiciones óptimas de separación para el sistema CE-UV fueron electrolito soporte de boratos 5 mM, pH=10.0, a 12kV y 215 nm, permite una buena separación e identificación simultanea de los analitos de interés.
- Bajo las condiciones óptimas del sistema de pre-concentración (LVSS-CE): tiempo de carga (3.7 min), tiempo de pre-concentración (3.7 min) con un voltaje de pre-concentración (5.5 kV) se obtienen factores de enriquecimiento de 3.64 hasta 88.0.
- La metodología propuesta permite obtener límites de detección competitivos con técnicas tradicionales, en términos de repetitividad y reproducibilidad en muestras complejas.
- El método propuesto LVSS-CE permite la determinación de aditivos de interés en muestras de agua de distinta procedencia (agua de grifo, preenvasada, de manantial). Adicionalmente se considera de bajo costo, ambientalmente amigable y aplicable en el análisis de aditivos en muestras complejas.

6. Bibliografía

- Ali, A. H.** (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Advances in Chemistry*, 6, 010-020.
- Arbeláez, P.**, Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2015). Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1393, 106-114.
- Aymara, P. I.** (2022). Consumo de drogas ilícitas y su relación con las infracciones cometidas por los adolescentes en el complejo policial Walter Rosales León, Lima 2021. [Tesis para título profesional, Universidad Norbert Wiener]. <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/20.500.13053/7279>
- Baez, M. R.** (2017). Integración de sensores electroquímicos basados en nanomateriales funcionales para la detección de contaminantes en aguas. [Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=229767>
- Bejarano, R. J. J.**, & Suárez, L. L. M. (2015). Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de los alimentos de venta en espacios públicos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 47(3), 349-360.
- Belz, M. C.**, Mairinger, R., Zannini, E., Ryan, L. A., Cashman, K. D., & Arendt, E. K. (2012). The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 493-501.
- 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, 11714-1717.

- Beristain**, S. C., Palou, E., & López, M. A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6(2), 64-78.
- Cagnasso**, C., López, L., Rodríguez, V., & Valencia, M. (2007). Estimación de la ingesta potencial de ácido etilendiaminotetraacético en niños y adolescentes argentinos, influencia de la fortificación de cereales para desayuno con sal férrica de este ácido. *Revista chilena de nutrición*, 34(2), 143-149.
- Cantellano**, M. A. G., & Zetina, L. M. M. (2015). La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XXI. *Latin-American Journal of Physics Education*, 9(4), 13.
- Carlóni**, F. J., Santini, A. O., Nasser, A. L. M., Pezza, H. R., de Oliveira, J. E., Melios, C. B., & Pezza, L. (2003). Potentiometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a silver electrode. *Food chemistry*, 83(2), 297-301.
- Carmona**, A. I. F. (2015). Determinación de antibióticos en fuentes de abastecimiento de agua superficial del área metropolitana, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV-F. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/9273/1/1080215113.pdf>
- Carrasco**, J. D. C. R., Delgado, C. Y. S., & Cobos, D. F. O. (2017). Contaminantes emergentes y su impacto en la salud. *Emerging contaminants and its impact on the health*. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca*, 35(2), 55-59.
- Castillo**, B., Ruiz, J. O., Manrique, M. A., & Pozo, C. (2020). Contaminación por plaguicidas agrícolas en los campos de cultivos en Cañete. *Revista Espacios*, 41(10).

- Cerrón, I. D. A., & Unterlass, M. M. (2018).** Síntesis ecoamigables de colorantes. *Revista de Química*, 32(1), 18-31.
- Cheng, C., Li, X., Xie, X., Chang, F., Li M., Zhu, Z. (2016).** Highly sensitive detection of cooper (I) and cooper (II) in cells specimens by CE-UV with a large-volume sample stacking. *Analytical Methods*, 8, 4272-4276.
- 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.
- Crevillén, A. G., de Frutos, M., & Diez-Masa, J. C. (2017).** On-chip single column transient isotachopheresis with free zone electrophoresis for preconcentration and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Microchemical Journal*, 133, 600-606.
- Cuellar M. L. I., & Funes Alvarado, M. A. (2013).** Determinación de aspartame, acesulfame K y sucralosa por espectrofotometría ultravioleta visible e infrarrojo en jugos dietéticos comercializados en el Municipio de Soyapango. [Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador]. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3269/>
- Cuenca, R. M. T. (2019).** Contaminantes emergentes: origen y destino. [Tesis de maestría, Universidad de Alcalá]. https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/41874/TFM_Martin_Escobar_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Doroteo, M. C. (2012).** Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación en discapacidad*, 1(2), 86-89.
- Ensuncho, A. E., Milanés, N., & Robles, J. R. (2015).** Remoción del colorante rojo allura en solución acuosa utilizando carbones activados obtenidos de desechos agrícolas. *Información tecnológica*, 26(2), 69-78.

- Fasanando, C., Sodi, B., Vásquez, L. & Leandro E. (2018).** Procesos de oxidación avanzada para la reducción de la concentración del amarillo ocaso fcf (e110). [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional del Callao]. <https://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/7175>
- Fernandes, V. N. O., Fernandes, L. B., Vasconcellos, J. P., Jager, A. V., Tonin, F. G., & de Oliveira, M. A. L. (2013).** Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection. *Analytical Methods*, 5(6), 1524-1532.
- Figueras, D. J. (2021).** Uso de edulcorantes en refrescos: una solución para la reducción del consumo de azúcares añadidos. [Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica de Catalunya]. <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/355070>
- Flores, A. J. F., Medrano, L. C., Pérez, E. E., Rodríguez, J. A., Camacho, M. R. L., & Ibarra, I. S. (2019).** Large-volume sample stacking with polarity switching for analysis of azo dyes in water samples by capillary electrophoresis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99(13), 1255-1267.
- Frazier, R. A., Inns, E. L., Dossi, N., Ames, J. M., & Nursten, H. E.** Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. *Journal of Chromatography A* 876, (2000), 213-220.
- García, G. C., Gortáres, M. P., & Drogui, P. (2011).** Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Química Viva*, 10(2), 96-105.
- García, M. J. (2024).** Determinación de colorantes alimentarios artificiales en alimentos. [Tesis de maestría, Universidad de Jaén]. <https://crea.ujaen.es/handle/10953.1/21348>

- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012).** Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2), 52-73.
- Godínez, R., & Aceves, P. (2014).** El surgimiento de la industria farmacéutica en México (1917-1940). *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45 (2), 55-68.
- Granda, O. I. D., Granda, B. C. D., & Baz, L. J. A. (2018).** Contaminantes emergentes: la nicotina en las aguas residuales domésticas como herramienta de análisis en salud pública. *Archivos de Bronconeumología*, 54(10), 495-496.
- Guardiola, R. T. (2020).** Antimicrobianos naturales presentes en colorantes alimentarios. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/157845>
- Herrero, O., Planelló, R., Gómez-Sande, P., Aquilino, M., & Morcillo, G. (2014).** Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. *Revista de toxicología*, 31(2), 176-186.
- Hidalgo, O. B. G. (2022).** Uso de colorantes alimentarios (artificiales y naturales) y su impacto en la salud: revisión de la literatura [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Chimborazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/9714>
- IUPAC. (1995).** Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities. *Pure and Applied Chemistry*, 67, 1699-1723.
- Jáquez, S. V., Ortega, V., Irigoyen, R., & González, L. S. (2013).** Comportamiento de plaguicidas persistentes en el medio ambiente. *Hojas divulgadoras*, 9(95), 2-28.

- Joyanes, C. V.** (2014). Determinación de edulcorantes artificiales en bebidas. [Trabajo de fin de grado, Universidad de Jaén]. https://crea.ujaen.es/bitstream/10953.1/554/1/TFG_JoyanesC%C3%A1rdenas%2CVirginia.pdf
- Juan, R. S.** (2013). La química del color en los alimentos. *Química Viva*, 12(3), 234-246.
- 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.
- Lara, A. D.** (2022). Determinación de edulcorantes por espectrofotometría visible en bebidas azucaradas consumidas en la provincia de Tungurahua [Tesis de licenciatura, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/34980>
- León, M. M.** (2017). Evaluación de eficiencia de dos marcas diferentes de benzoato de sodio en zumo de naranja sobre pruebas microbiológicas. [Tesis de licenciatura, Universidad Ricardo Palma]. <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/908>
- Llamas N. E., Di Niezo 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.
- Ludwig, N., Kusumoto, T., Galindo C., Peaupardin, P., Pin, S., Renault, J.-P., Muller, D., Yamauchi, T., Kodaira, S., Barillon, R. & Raffy Q.** (2018). Radiolysis of phenylalanine in solution with BraggPeak energy protons. *Radiation Measurements* 116, 55-59.

- Ma, B., Song, Y. Z., Niu, J. C., & Wu, Z. Y. (2016).** Highly efficient sample stacking by enhanced field amplification on a simple paper device. *Lab on a Chip*, 16(18), 3460-3465.
- Martí, M., Alonso, C., Manich, A. M., & Coderch Negra, M. L. (2020).** Acabados textiles retardantes de llama. Toxicidad por la vía dérmica. *Revista de Química e Industria Textil*, 233, 11-21.
- Medrano, L. C., Flores-Aguilar, J. F., Islas, G., Rodríguez, J. A., & Ibarra, I. S. (2019).** Solid-phase extraction and large-volume sample stacking-capillary electrophoresis for determination of artificial sweeteners in water samples. *Food analytical methods*, 12, 526-533.
- Molins, D. (2017).** Productos de cuidado personal en el medio ambiente: presencia, destino y efectos. [Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya]. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/115992/TDMD1de2.pdf>
- Mooradian, A. D., Smith, M., & Tokuda, M. (2017).** The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical nutrition eSPen*, 18, 1-8.
- Murray, S., Tulloch, A., Criscitelli, K., Avena, N. M. (2016).** Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: Relevance to low calorie sweeteners. *Physiology and behavior*, 164, 504-508.
- Ordoñez E.Y., Quintana J.B., Rodil R., Cela R. (2012).** Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1256, 197-205.

- Pacheco, F. A.** (2019). Estimaciones del consumo de drogas ilícitas derivadas del análisis de aguas residuales: Una revisión crítica. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 51(1), 69-80.
- Pacheco, T. G. J.** (2018). Determinación de Tartrazina en Bebidas Citricas Artificiales por Cromatografía Liquida de Alta Resolucion (Hplc) y su Efecto Citotoxico Mediante Ensayos de Viabilidad Sobre Lineas Celulares de Cancer. [Tesis de licenciatura, Universidad Católica Santa María]. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/8169>
- Pachés, G. M. A. V.** (2020). Contaminantes emergentes. Universidad Politécnica de Valencia, 1-9.
- Pari, C. & Yunior, F.** (2018). Determinación de la concentración del colorante tartrazina (E-102) en papillas procesadas para bebés expandidas en la ciudad de Arequipa-2017. [Tesis profesional, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/8008>
- Peña, A. A., & Castillo, A. A.** (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 29-42.
- Quiroga, P.** (2013). Electroforesis capilar. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 12-136.
- Quispe, C., Mollinedo, P. L., Peñarrieta, L. & Mauricio, J.** (2012). Reciclado de residuos químicos y determinación de cromo en tintas. [Tesis doctoral, Universidad Mayor de San Andres]. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/18065>

Roca, S. P., Mendez, V. V., Miranda, J. M., Nebot, C., Cardelle, C. A., Franco, C. M. & Cepeda, A. (2018). Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota-a review. *Journal of Physiology and Biochemistry* 74, 69-83.

Rodrigo, M. A., Cañizares, P., Llanos Huesca, F. J., Lobato, J., Martinez R., Saez, G. K. C., & Palomar, P. M. E. (2014). Aplicaciones electroquímicas al tratamiento de aguas residuales. Reverté Ediciones, SA de CV.

Rodríguez, M. C., Schenone, A. V., Sobrero, M. S., & Marsili, N. (2013). Cuantificación simultánea de colorantes en bebidas deportivas utilizando espectroscopia visible y PLS-1. *Revista FABICIB*, 17, 74-84.

Ruiz, B. M. L. (2020). *Cromatografía en capa fina y en columna*. Ediciones Universidad Simón Bolívar.
<https://bonga.unisimon.edu.co/handle/20.500.12442/7984?show=full>

Salgado, T., A., M. (2021). Evaluación de técnicas cromatográficas acopladas a masas para la determinación de 9, 10 fenantrenoquinona.

Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(1), 153-170.

Serrano, M. F. O., Martínez, M. D. C. L., & de la Serrana, E. L. G. (2012). Aspectos bromatológicos de conservantes y colorantes: Toxicología alimentaria. Ediciones Díaz de Santos. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3640/SATART08.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Siddique**, S., Kubwabo, C., & Harris, S. A. (2016). A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. *Emerging Contaminants*, 2(4), 204-219.
- Silveira**, G. M. I., Aldana, M. M. L., Piri, S. J., Valenzuela, Q. A. I., Jasa, S. G., & Rodríguez, O. G. (2018). Plaguicidas agrícolas: un marco de referencia para evaluar riesgos a la salud en comunidades rurales en el estado de Sonora, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34 (1), 7-21.
- Stashenko**, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Tascon**, M. (2015). Desarrollo de sistemas de preconcentración " on-line" para análisis de muestras de interés biológico mediante electroforesis capilar [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/45106/Documento_completo__.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Tejada**, C., Quiñonez, E., & Peña, M. (2014). Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos. Una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 80-101.
- Vallejo**, R. Y. J., Barrios, C. L., & Anaya, G. J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*, 35(2), 19-25.
- Vargas**, M. A. (2023). Estudio de técnicas de extracción y análisis para la determinación de retardantes de llama en alimentos. [Tesis doctoral, Universidad de Jaén]. <https://crea.ujaen.es/handle/10953.1/20125>

- Vistuba** J. P., Dolzan M. D., Vitali L., Leal de Oliveira M. A. & Micke G. A. (2015). Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1396, 148–152.
- Weinert** L.P. Redigolo H., De Oliveira J., Paezza L. (2004). A simplified spectrophotometric method for routine analysis of saccharin in comercial noncaloric sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7788-7792.
- Wilkinson**, J., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S. & Swinden, J. Occurrence. (2017). Fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution* 231, 954-970.
- Xu**, X., Liu, L., Jia, Z., & Shu, Y. (2015). Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified sample stacking–sweeping technique. *Food Chemistry*, 176, 219-225.
- Xu** X., Jia Z., Shu Y., Liu L. (2015). Dynamic pH junction–sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acids in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography B* 980, 20-27.
- Zaruma**, P., Proal, J., Hernández, I. C., & Salas, H. I. (2018). Los colorantes textiles industriales y tratamientos óptimos de sus efluentes de agua residual: una breve revisión. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (19), 38-47.
- Zhang**, X. Z., Meng, Q. X., Lu, L., Cui, Z. L., & Ren, L. P. (2015). The effect of calcium propionate supplementation on performance, meat quality, and mRNA expression of finishing steers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 24(2), 100-106.

Zhu Y., Gou 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.

Zhu, G., Sun, L., & Dovičhi, N. J. (2016). Dynamic pH junction preconcentration in capillary electrophoresis- electrospray ionization-mass spectrometry for proteomics analysis. *Analyst*, 141(18), 5216-5220.

Zygler, A., Wasik, A., & Namieśnik, J. (2010). Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. *Talanta*, 82(5), 1742-1748.