



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos

**Determinación de edulcorantes en bebidas carbonatadas
mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas**



AUTOR:

Belén Franco Vázquez

TUTOR:

Juan José Jiménez Sevilla

Valladolid - Julio 2021

Contenido

Figuras y Tablas	4
Lista de abreviaturas	6
1. Introducción	10
1.1. Aditivos alimentarios	10
1.2. Edulcorantes habituales en las bebidas con gas	13
1.2.1. Acesulfamo K	13
1.2.2. Sacarina	15
1.2.3. Ciclamato	17
1.2.4. Sucralosa	18
1.2.5. Aspartamo	19
1.3. Métodos de análisis	21
1.3.1. Pretratamiento de muestras	22
1.3.2. Análisis instrumental	23
1.3.3. Detectores	27
1.4. Concentraciones en el medio ambiente	29
1.5. Concentraciones en alimentos y bebidas	31
1.6. Legislación	32
1.7. Análisis multicomponente	35
2. Objetivos	37
3. Procedimiento experimental	38
3.1. Muestras analizadas	38
3.2. Reactivos y material	39
3.3. Preparación de patrones y línea de calibrado	40
3.4. Preparación de muestra	41
3.5. Determinación de los edulcorantes	41

3.5.1.	Cromatografía líquida de alta resolución HPLC	42
3.5.2.	Espectroscopía UV-Vis	43
3.5.3.	Fluorescencia.....	44
4.	Resultados y discusión	45
4.1.	Espectros de los compuestos en H ₂ O y HCl.....	45
4.2.	Espectros de las gaseosas	52
4.3.	HPLC.....	54
4.3.1.	Ensayos previos.....	54
4.3.2.	Análisis de muestras	57
4.4.	Método de adiciones patrón	63
4.5.	Fluorescencia.....	66
4.6.	Análisis multicomponente	69
4.6.1.	Determinación conjunta de los analitos	69
4.6.2.	Determinación de sacarina y acesulfamo K.....	71
4.7.	Comparación de los resultados de sacarina y acesulfamo K.....	72
5.	Conclusiones	75
6.	Bibliografía.....	76

Figuras y Tablas

Figura 1: Estructura del Acesulfamo K.....	13
Figura 2: Estructura de la sacarina	15
Figura 3: Estructura del ciclamato	17
Figura 4: Estructura de la sacarosa (izquierda) y la sucralosa (derecha)	18
Figura 5: Estructura del aspartamo	19
Figura 6: Etiqueta de Coca-Cola Zero azúcar en España	20
Tabla 1: : Concentraciones de los distintos edulcorantes en algunas muestras.....	31
Tabla 2: Concentraciones máximas permitidas de los edulcorantes en la CEE	34
Tabla 3: Edulcorantes presentes en las gaseosas estudiadas	38
Tabla 4: Parámetros cromatográficos	42
Tabla 5: Tiempos de retención de sacarina y acesulfamo K.....	42
Figura 7: Espectro UV del Acesulfamo K en agua.....	45
Figura 8: Espectro UV del Acesulfamo K en HCl	46
Figura 9: Espectro UV del ciclamato en agua	46
Figura 10: Espectro UV del ciclamato en HCl	47
Figura 11: Espectro UV de la sacarina en agua.....	47
Figura 12: Espectro UV de la sacarina en HCl.....	48
Figura 13: Espectro UV de la sucralosa en agua.....	48
Figura 14: Espectro UV de la sucralosa en HCl	49
Figura 15: Espectro UV del citrato en agua	49
Figura 16: Espectro UV del citrato en HCl	50
Tabla 6: pKa de los compuestos estudiados.....	51
Figura 17: Espectro UV de la Muestra 1	52
Figura 18: Espectro UV de la Muestra 2	52
Figura 19: Espectro UV de la Muestra 3	53
Figura 20: Espectro UV de la Muestra 4	53
Figura 21: Cromatograma de la Muestra 1 con fase móvil acuosa	55
Figura 22: Cromatograma de la Muestra 1 diluida dopada con citrato	56
Figura 23: Línea de calibrado en HPLC para la sacarina con el detector UV (n=2)	57
Figura 24: Línea de calibrado en HPLC para la sacarina con el detector FL (n=2).....	58

Figura 25: Línea de calibrado en HPLC para el Acesulfamo K con el detector UV (n=2)	59
Tabla 7: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de sacarina con el detector UV (p=0,05; n=2)	60
Tabla 8: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de sacarina con el detector FL (p=0,05; n=2)	60
Tabla 9: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado del acesulfamo K con el detector UV (p=0,05; n=2)	60
Tabla 10: Concentración de sacarina en las muestras a partir del detector UV	61
Tabla 11: Concentración de sacarina en las muestras a partir del detector FL	61
Tabla 12: Concentración de acesulfamo K en las muestras a partir del detector UV	61
Figura 26: Cromatograma de la Muestra 2 mediante el método isocrático	62
Tabla 13: Concentraciones de los analitos añadidas	63
Figura 27: Calibrado de adiciones patrón del ácido cítrico en la Muestra 1	64
Figura 28: Calibrado de adiciones patrón del ácido ciclámico en la Muestra 2	64
Tabla 14: Concentración del ácido cítrico y ácido ciclámico en las muestras	65
Figura 29: Espectro de emisión de la sacarina en agua	66
Figura 30: Espectro de emisión de la sacarina en HCl	67
Figura 31: Línea de calibrado para la sacarina (n=2) en fluorescencia	67
Tabla 15: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado (p=0,05; n=2)	68
Tabla 16: Concentración de sacarina en las muestras	68
Tabla 17: Matriz de Absortividades para múltiples longitudes de onda	69
Tabla 18: Concentraciones de los compuestos estudiados	70
Tabla 19: Matriz de absortividades para la sacarina y el acesulfamo K	71
Tabla 20: Concentraciones de sacarina y acesulfamo K en las muestras	71
Tabla 21: Concentración de sacarina en las muestras obtenidas por los distintos métodos utilizados	72
Tabla 22: Concentración de acesulfamo K en las muestras obtenidas por los distintos métodos utilizados	72
Tabla 23: ANOVA de un factor para la Muestra 1	73
Tabla 24: ANOVA de un factor para la Muestra 2	73
Tabla 25: ANOVA de un factor para la Muestra 4	74

Lista de abreviaturas

ACE acesulfamo

ANOVA análisis de la varianza

ASP aspartamo

CE electroforesis capilar

CYC ciclamato

EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ELSD dispersión de luz por evaporación

FAO Organización Mixta para la Agricultura y la Alimentación

FDA Food and Drugs Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

FL fluorescencia

FT transformada de Fourier

GC cromatografía de gases

GRAS generalmente reconocidos como seguros

HILIC cromatografía de interacción hidrófila e iónica

HPLC cromatografía líquida de alta resolución

HTLC cromatografía líquida de alta temperatura

IC cromatografía iónica

IDA ingesta diaria aceptable

JECFA Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

LC cromatografía de líquidos

LLE extracción líquido-líquido

LLME microextracción líquido-líquido

LPME microextracción en fase líquida

MPL niveles máximos permitidos

MUD dosis máxima utilizable

MS espectrometría de masas

OMS Organización Mundial de la Salud

SAC sacarina

SALLE salazón combinada con la extracción líquido-líquido

SCFEC Comité Científico de Alimentos de la Comisión Europea

SPE extracción en fase sólida

SUC sucralosa

TLC cromatografía de capa fina

UV ultravioleta

ZCE electroforesis capilar de zona

Resumen

Los edulcorantes son aditivos alimentarios habituales en una gran variedad de bebidas, en particular de las bebidas carbonatadas y aromatizadas, denominadas comúnmente gaseosas. En la bibliografía se pueden consultar las concentraciones medidas de algunos edulcorantes en diversos productos alimentarios, pero no hay datos sobre las cantidades presentes en las bebidas carbonatadas, cantidades que tienen unos límites máximos legislados. En este contexto, se ha evaluado en este trabajo la posibilidad de determinar 4 edulcorantes y el ácido cítrico, aditivo habitual en este tipo de bebidas, mediante HPLC en fase inversa con una columna cromatográfica ODS y un detector convencional, y mediante dos técnicas espectroscópicas: absorción UV-visible y espectrofluorimetría. La preparación de la muestra es sencilla, solo se debe desgasificar y diluir las muestras. Así, se ha comprobado que la sucralosa no se puede determinar mediante estas técnicas debido a su muy baja absorción de radiación UV, mientras que la sacarina y el acesulfamo K pueden ser determinados mediante ambos tipos de técnicas. El ciclamato y el ácido cítrico no han podido ser determinados mediante HPLC ni de forma selectiva mediante las técnicas espectroscópicas, por lo que se ha propuesto un método de calibración de adiciones patrón para su determinación mediante espectroscopía UV-visible. La concentración de sacarina, acesulfamo K, ciclamato y ácido cítrico ha sido determinada en 4 muestras de gaseosa de diferente marca comercial.

Abstract

Sweeteners are common food additives in a wide variety of beverages, such as carbonated and flavored beverages, commonly referred to as soft drinks. In the literature, the measured concentrations of some sweeteners in various food products can be consulted, but there is no data on the amounts in carbonated beverages, which have legislated maximum limits. In this context, in this work, we evaluate the possibility of determining 4 sweeteners and citric acid, a common additive in this beverages, by HPLC in reverse phase with an ODS chromatographic column and conventional detectors, and by two spectroscopic techniques: UV-Vis absorption and spectrofluorimetry. Sample preparation is very simple, we just need to sonicate and dilute the samples. Thus, it has been found that sucralose cannot be determined by these techniques due to its very low absorption of UV radiation, while saccharin and acesulfame K can be determined by both types of techniques. Cyclamate and citric acid have not been able to be determined by HPLC or selectively by spectroscopic techniques, therefore a calibration method of standard additions has been proposed for their determination by UV-Vis spectroscopy. The concentration of saccharin, acesulfame K, cyclamate and citric acid has been determined in 4 soda samples of different commercial brands.

1. Introducción

1.1. Aditivos alimentarios

En los últimos años, se ha incrementado de manera considerable el consumo de dulces, así como de productos azucarados. Todo ello implica un aumento importante en el número de personas que sufren de obesidad, diabetes o caries dental. Debido a ello, el consumo de este tipo de productos es considerado uno de los mayores problemas de salud de la sociedad (Herrmannova, Krivankova, Bartos, & Vytras, 2006), (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009).

Con el fin de evitar problemas en la salud y en la dieta asociados al consumo de productos azucarados, es habitual que se produzca la sustitución de azúcar por edulcorantes artificiales en ellos (Herrmannova et al., 2006).

Los edulcorantes se dividen en dos categorías principales: compuestos calóricos o nutritivos, y compuestos no calóricos o no nutritivos. Los edulcorantes nutritivos se corresponden con los carbohidratos o sus derivados, como la glucosa, fructosa, maltosa... Por el contrario, los edulcorantes no nutritivos no pertenecen a ningún grupo químico concreto, y son los edulcorantes artificiales o sintéticos. Los más utilizados son la sacarina, el ciclamato, aspartamo, sucralosa y acesulfamo de potasio, que son mucho más dulces que el azúcar, entre 30 y 13000 veces (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009), (Li et al., 2021). De todos ellos, los más utilizados se corresponden con la sacarina, el ciclamato y el aspartamo, que son los permitidos para el uso en aproximadamente 90 países (Armenta, Garrigues, & de la Guardia, 2004).

Dentro de los edulcorantes no nutritivos, nos encontramos dos grupos, los edulcorantes intensos, y a granel. Los edulcorantes a granel, como los alcoholes de azúcar, proporcionan textura, así como efectos conservantes, y tienen un dulzor equivalente o menor a la sacarosa. A los alcoholes de azúcar se les ha conferido la categoría “quantum satis”, lo que implica que se consideran lo suficientemente inofensivos para que no sea necesaria una limitación específica en cuanto a su cantidad. Los edulcorantes intensos son aquellos con capacidad edulcorante mayor a la sacarosa; algunos ejemplos se corresponden con los arriba mencionados (Shah & Jager, 2017).

INTRODUCCIÓN

Los alimentos que contienen edulcorantes artificiales en su composición entran dentro del grupo de alimentos bajos en calorías o sin azúcar ya que estos compuestos proporcionan pocas o ninguna caloría en los alimentos, por lo que son útiles para controlar el peso corporal, así como los niveles de insulina (Li et al., 2021). Los edulcorantes artificiales no aportan energía o lo hacen de manera insignificante, ya que no se descomponen como carbohidratos. Además, el nivel de insulina no se ve afectado con su consumo, lo cual implica que son aptos para las personas diabéticas. En el caso de los edulcorantes intensos mencionados anteriormente, se utilizan cantidades muy pequeñas debido a su gran dulzor, por lo que se consigue que la ingesta de calorías también sea muy pequeña. Estos compuestos también ayudan a prevenir las caries, ya que la mayoría no se metaboliza como los azúcares, o solo se fermentan de manera ligera (Scheurer, Brauch, & Lange, 2009).

No obstante, hasta ahora no existe un “edulcorante ideal”, entendiéndose por ello aquel que presenta todas las ventajas de los edulcorantes artificiales sin tener ningún tipo de problema o efecto adverso asociado a su consumo (Herrmannova et al., 2006).

Estos compuestos son muy utilizados para sustituir el azúcar en alimentos, bebidas gaseosas, alcohólicas, dulces y alimentos en conserva entre otros (Li et al., 2021). También se utilizan en refrescos junto con colorantes y conservantes con el fin de proporcionar una mayor vida útil y un sabor y aroma mejorado, logrando así la apariencia deseada (Gao et al., 2013).

Los edulcorantes artificiales son más baratos que el azúcar natural, lo que implica una reducción en el coste de producción de algunos alimentos y bebidas, promocionando así su uso (Ferrer & Thurman, 2010).

Los edulcorantes pueden utilizarse por separado, o en combinaciones de los mismos. En la actualidad, lo más habitual es utilizar mezclas de edulcorantes en bebidas, así como en alimentos sin azúcar y dulces. El uso de este tipo de combinaciones, presenta algunas ventajas, como puede ser el efecto sinérgico en varias combinaciones; esto es, la obtención de un efecto combinado o aditivo de los compuestos en lo que respecta a la intensidad y permanencia de su sabor (Armenta et al., 2004). Debido a que los edulcorantes artificiales introducen en los alimentos distintos matices en los sabores,

INTRODUCCIÓN

se suelen agregar dos o tres diferentes con el fin de obtener un sabor dulce agradable (Lim et al., 2013).

Un ejemplo de combinación, es la mezcla sacarina-ciclamato en proporción 1:10. En este caso, el regusto amargo de la sacarina queda enmascarado por el ciclamato, y debido al efecto aditivo, el poder edulcorante de la muestra es mayor, ya que la sacarina es en torno a 300 veces más dulce que la sacarosa en comparación con el ciclamato, tan solo 30 veces más dulce que ésta (Shah & Jager, 2017), (Herrmannova et al., 2006).

El contenido de edulcorantes en los alimentos y bebidas está definido y regulado por las correspondientes autoridades, y se debe cumplir con la cantidad estipulada (Herrmannova et al., 2006).

Todos los ingredientes, incluso los colorantes, conservantes y edulcorantes, deben estar presentes en las etiquetas de los alimentos en países como China, Japón y la Unión Europea. Algunos de estos compuestos suponen un riesgo potencial para la salud y pueden provocar reacciones alérgicas en algunos casos. Debido a ello, la composición de los productos alimenticios debe coincidir por completo con los ingredientes que aparecen en las etiquetas; el consumidor debe estar informado (Gao et al., 2013).

Un mayor contenido a lo estipulado de algunos edulcorantes, o un consumo excesivo de estos compuestos, puede provocar reacciones o efectos adversos que pueden variar desde alergias a diarreas entre otras (Herrmannova et al., 2006). Debido a ello, es necesario llevar a cabo un seguimiento reglamentario en el contenido de los denominados edulcorantes intensos en los alimentos (Li et al., 2021). Además, otros autores afirman que pueden asociarse algunos efectos nocivos al consumo excesivo de edulcorantes artificiales, como puede ser el riesgo ocasionado de un aumento de peso, diabetes tipo II, hipertensión, u otras enfermedades vasculares. Por ello, es preciso controlar su uso en alimentos (Tighrine, Amir, Alfaro, Mamou, & Nerin, 2019).

Pese a la información de algunos efectos negativos de los edulcorantes artificiales sobre los animales, actualmente está aceptado que los edulcorantes artificiales son seguros para el consumo humano dentro de los límites legales establecidos (Gan, Sun, Wang, & Feng, 2013).

1.2. Edulcorantes habituales en las bebidas con gas

A continuación, se muestran los distintos compuestos presentes en las gaseosas estudiadas.

1.2.1. Acesulfamo K

El acesulfamo, 6-metil-1, 2, 3-oxatiazina-4(3H) -ona-2, 2-dióxido ($C_4H_4KNO_4$) es un edulcorante relativamente reciente que se agrega habitualmente en alimentos y bebidas, principalmente en bebidas dietéticas junto con el aspartamo como sustituto del azúcar (Herrmannova et al., 2006), (Üstün Özgür & Kasapoğlu, 2019).

La notación empleada en la industria alimentaria para este compuesto es E-950.

El acesulfamo generalmente se vende como sal de potasio. Su estructura es la que se muestra a continuación en la Figura 1, y se puede apreciar que presenta ciertas similitudes con la sacarina, lo que se pone de manifiesto en que ambos presentan un regusto metálico y amargo a elevadas concentraciones (Ellis, 1995).

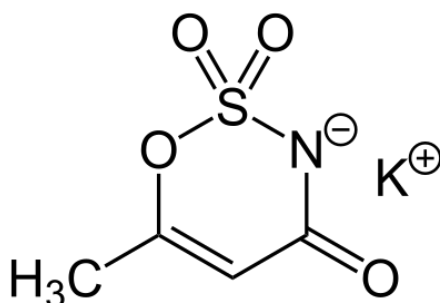


Figura 1: Estructura del Acesulfamo K

El acesulfamo K fue descubierto en 1967 tras el descubrimiento de manera accidental de un compuesto muy similar a él. Su capacidad edulcorante es en torno a 200 veces más elevada que la sacarosa, lo que permite su uso en pequeñas cantidades. Debido a su regusto metálico y amargo, es habitual utilizarlo en combinación con otros edulcorantes. Presenta una buena solubilidad en agua y estabilidad a altas temperaturas de cocción y horneado, por lo que también es muy utilizado en repostería y confitería (Shah & Jager, 2017).

INTRODUCCIÓN

Distintos estudios farmacocinéticos ponen de manifiesto que el acesulfamo se absorbe completamente, no se metaboliza, y se excreta rápidamente sin cambios, por lo que no se asocian efectos adversos a su uso y consumo (Tighrine et al., 2019).

El uso del acesulfamo K está aprobado en unos 90 países y en la literatura científica no se han informado de problemas de salud asociado a su consumo. No obstante, en 2008, se publicó un estudio que ponía de manifiesto una serie de daños en el ADN debido a la exposición a este compuesto, por lo que sus autores sugirieron restringir su uso (Scheurer et al., 2009).

1.2.2. Sacarina

La sacarina, 1, 2-benzoisotiazol-3(2H) -ona-1, 1-dióxido ($C_6H_4COSO_2NH$) es el edulcorante más antiguo conocido y uno de los más fuertes en el mercado, ya que su capacidad edulcorante es en torno a 500 veces mayor que la de la sacarosa, lo que permite que también pueda usarse en cantidades muy pequeñas. Es muy habitual el uso de la sal de sodio, ya que se disuelve mejor que la sacarina y sigue teniendo una capacidad edulcorante muy elevada, de en torno a 450 veces mayor que la sacarosa (Armenta et al., 2004).

La notación empleada en la industria alimentaria para este compuesto es E-954 (Lino & Pena, 2010).

La estructura de la sacarina es la que se muestra a continuación en la Figura 2 y, como ya se mencionó anteriormente, presenta ciertas similitudes con la estructura del acesulfamo K, por lo que no es de extrañar que ambos compuestos presenten un regusto amargo y metálico (Bruno, Cardoso, Maciel, Vokac, & da Silva Junior, 2014).

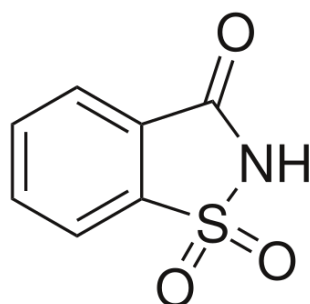


Figura 2: Estructura de la sacarina

La sacarina fue descubierta por casualidad en 1879 por la Universidad Johns Hopkins. Tras el descubrimiento del ciclamato años después, se empezó a comercializar una mezcla de ciclamato-sacarina en proporciones 10:1, cuyo dulzor era mayor que la suma de ambos y permitía enmascarar el regusto amargo de uno, y desagradable del otro (Bruno et al., 2014). No obstante, en 1970 se prohibió su comercialización debido a la aparición de cáncer de vejiga en ratas asociado a esta mezcla tras introducir altas dosis en la dieta. Desde entonces, se han mostrado numerosas evidencias de que la causa de los tumores en las ratas es debida a la sacarina, y no al ciclamato, por lo que a

INTRODUCCIÓN

priori resulta un tanto sorprendente que la sacarina se siga comercializando mientras el ciclamato esté prohibido en numerosos países (Ellis, 1995).

La razón de ello, es que realmente la sacarina no es mutagénica, y por tanto, su uso sigue estando aprobado para el consumo humano ya que se ha demostrado que el mecanismo por el que se produce el cáncer de vejiga en las ratas, no es relevante para el ser humano, siendo por tanto, seguro para éstos (Scheurer et al., 2009), (Lino & Pena, 2010).

Según el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA por sus siglas en inglés), la sacarina no se metaboliza y se sospecha que es la responsable de inducir el cáncer de vejiga en ratas macho, pero sin ser relevante para el ser humano, lo que estaría de acuerdo a lo anteriormente mencionado (Tighrine et al., 2019).

La sacarina presenta una elevada solubilidad así como estabilidad en almacenamiento y en los alimentos, incluso en el tratamiento térmico (Herrmannova et al., 2006), (Shah & Jager, 2017).

1.2.3. Ciclamato

El ciclamato, la sal monosódica del ácido ciclohexilsulfámico ($C_6H_{12}NO_3SNa$), es un edulcorante con una capacidad de dulzor en torno a 30-40 veces mayor que el azúcar de mesa, la sacarosa (Armenta et al., 2004).

La notación utilizada en la industria alimentaria para este compuesto es E-952.

La estructura del ciclamato en su forma de sal monosódica es la que se muestra a continuación en la Figura 3.

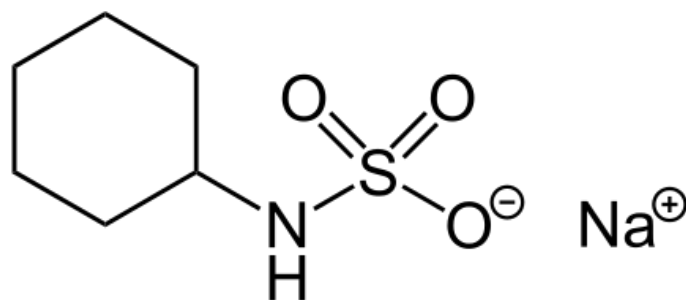


Figura 3: Estructura del ciclamato

El ciclamato fue descubierto de manera accidental en 1937 en la Universidad de Illinois. Se comercializó durante unos años en una mezcla con sacarina en proporciones 10:1 ciclamato-sacarina hasta su prohibición en 1970 debido a unos estudios que establecían una relación entre el cáncer de vejiga en ratas y el consumo de esta mezcla (Ellis, 1995).

A raíz de dichos estudios, se prohibió el uso del ciclamato como agente edulcorante en numerosos países. Pese a que tiempo después se han puesto de manifiesto numerosas evidencias de que no hay relación entre la aparición de cáncer y el consumo de ciclamato, su uso no está tan ampliamente extendido como el de otros edulcorantes, estando aún prohibido en numerosos países. Un ejemplo de ello es el caso de Estados Unidos, donde no se permite su uso desde 1970 a la espera de que sea reprobado por la FDA (Scheurer et al., 2009). En este país dicha prohibición implica que el ciclamato no puede agregarse ni ser detectable en los alimentos (Shah & Jager, 2017).

En el caso de los países en los que sí está aprobado su uso, como es el caso de la Unión Europea, el ciclamato se utiliza como agente edulcorante en una amplia gama de

INTRODUCCIÓN

alimentos y bebidas bajas en calorías, como por ejemplo la Coca Cola Zero (Shah & Jager, 2017).

1.2.4. Sucralosa

La sucralosa ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$) se corresponde con un compuesto clorado derivado de la molécula de azúcar, la sacarosa. En la sucralosa se han sustituido los grupos hidroxilo por cloro en el carbono 4 del anillo pirano, y en los carbonos 1 y 6 del anillo furano. A continuación, en la Figura 4 se muestra en primer lugar la estructura de la sacarosa, el azúcar de mesa común, y posteriormente la estructura de la sucralosa, con el fin de apreciar las similitudes entre ambas.

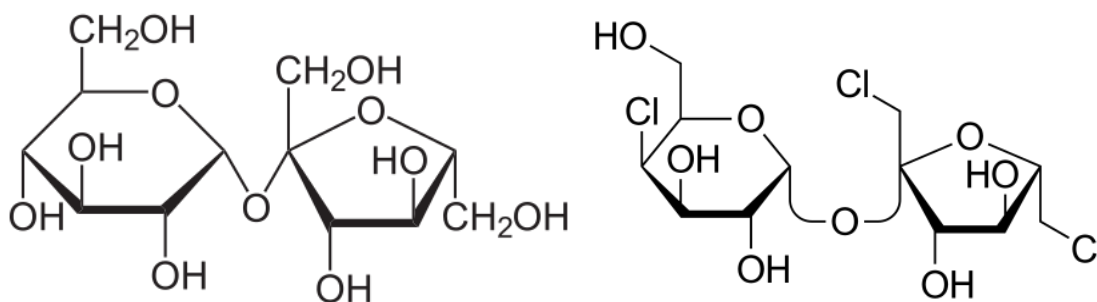


Figura 4: Estructura de la sacarosa (izquierda) y la sucralosa (derecha)

La sucralosa fue descubierta en 1976 en Reino Unido (Ellis, 1995). Es un azúcar polar clorado con cinco grupos hidroxilo y 3 grupos cloro siendo, por tanto, un compuesto organoclorado. Se produce sintéticamente a partir de sacarosa mediante la sustitución selectiva de tres grupos hidroxilo por átomos de cloro (Ferrer & Thurman, 2010).

La notación utilizada en la industria alimentaria para este compuesto es E-955.

La sucralosa tiene una capacidad edulcorante muy elevada, siendo aproximadamente unas 600 veces más dulce que la sacarosa. Es estable térmicamente, lo que permite que pueda ser utilizada en el proceso de cocción y horneado (Shah & Jager, 2017).

Este compuesto está aprobado para su uso en numerosos países, un ejemplo de ello son Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea entre otros (Ferrer & Thurman, 2010). Sin embargo, existe cierta preocupación acerca de su seguridad ya que se trata

INTRODUCCIÓN

de un derivado clorado y otros compuestos similares, como las dioxinas y los pesticidas, están relacionados con efectos cancerígenos o tóxicos. No obstante, diversos estudios ponen de manifiesto que su consumo es seguro para el ser humano, lo que hace que muchos organismos reguladores lo avalen (Shah & Jager, 2017).

1.2.5. Aspartamo

El aspartamo, éster metílico del dipéptido L-aspartil-L-fenilalanina ($C_{14}H_{18}N_2O_5$), es un edulcorante artificial bajo en calorías muy utilizado en refrescos y alimentos (Herrmannova et al., 2006). Presenta una elevada capacidad edulcorante, de en torno a 180-200 veces mayor que la sacarosa, por lo que no es necesario añadir grandes cantidades (Shah & Jager, 2017).

La notación utilizada en la industria alimentaria para este compuesto es E-951.

El aspartamo fue descubierto por casualidad en 1965 en la farmacéutica “G. D. Searle and Co.”. La dulzura de este compuesto fue muy inesperada debido a que todos los dipéptidos anteriores que se habían probado, habían resultado amargos (Ellis, 1995). La estructura de este compuesto se muestra a continuación en la Figura 5.

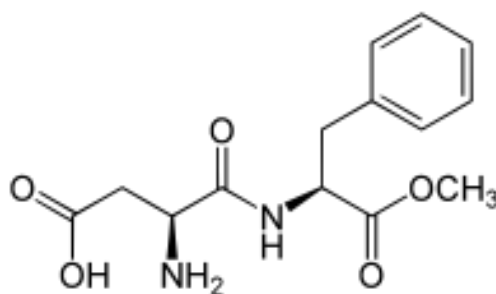


Figura 5: Estructura del aspartamo

Las limitaciones de este compuesto se encuentran principalmente en su tendencia a hidrolizarse, lo que limita en cierta medida su vida útil, haciendo que no pueda almacenarse de manera prolongada, así como su sensibilidad al calor, lo que impediría su uso en procesos de horneado. No obstante, este último problema se solventó mediante una tecnología de encapsulación por la cual el aspartamo se recubría de un material que se derrite al final del ciclo de horneado protegiéndolo de las condiciones

INTRODUCCIÓN

de calor y humedad que se dan en el proceso, y permitiendo que se libere después (Ellis, 1995).

El aspartamo es un compuesto relativamente controvertido con respecto a sus efectos sobre la salud, ya que se ha informado de algunos efectos neurológicos adversos, así como cáncer en ratas (Shah & Jager, 2017). Este compuesto se metaboliza en el cuerpo en ácido aspártico, metanol y fenilalanina, que no puede ser metabolizado por personas que sufren un trastorno metabólico hereditario conocido como fenilcetonuria. Un alto nivel de fenilalanina en el plasma origina toxicidad para el desarrollo en aquellas personas con este trastorno. Por ello, los productos que contengan aspartamo deben etiquetarse de tal forma que se indique la presencia de una fuente de fenilalanina. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 6. Pese a estas controversias, ha sido aprobado en numerosos países por los organismos regulatorios correspondientes, como puede ser la FDA en Estados Unidos, o la Unión Europea (Tighrine et al., 2019), (Bidlingmeyer & Schmitz, 1991), (Scheurer et al., 2009).



ZERO AZÚCAR

Coca-Cola

Ingredientes: agua carbonatada, colorante: E-150d, edulcorantes: ciclamato sódico, acesulfamo K y aspartamo, acidulante: ácido fosfórico, aromas naturales (incluyendo cafeína) y corrector de acidez: citrato sódico.

Contiene una fuente de fenilalanina.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL			
Por:	100 ml	330 ml	(%*)
Valor energético:	0,9 kJ/0,2 kcal	2,7 kJ/1 kcal	(0%)
Grasas:	0 g	0 g	(0%)
de las cuales saturadas:	0 g	0 g	(0%)
Hidratos de carbono:	0 g	0 g	(0%)
de los cuales azúcares:	0 g	0 g	(0%)
Proteínas:	0 g	0 g	(0%)
Sal:	0,02 g	0,06 g	(1%)

*Ingesta de referencia de un adulto medio (8.400 kJ/2.000 kcal).

Figura 6: Etiqueta de Coca-Cola Zero azúcar en España

Existe un derivado del aspartamo, el neotamo, que presenta la ventaja de ser más seguro para el consumo de personas con fenilcetonuria ya que impide la descomposición en fenilalanina. Tiene una capacidad edulcorante entre 7000 y 13000 veces mayor que la sacarosa y presenta un sabor similar a ella. Además, se trata de un compuesto termoestable, siendo otra ventaja con respecto al aspartamo. Su uso está

aprobado en diversos países como Estados Unidos y la Unión Europea entre otros (Shah & Jager, 2017).

1.3. Métodos de análisis

Debido a que las concentraciones permitidas son muy pequeñas, y que a menudo suelen utilizarse combinaciones de distintos edulcorantes, es necesario tener métodos analíticos fiables, sensibles y cuantitativos que permitan la determinación simultánea de varios edulcorantes en una amplia gama de matrices alimentarias con el fin de garantizar la seguridad alimentaria (Üstün Özgür & Kasapoğlu, 2019).

Tras llevar a cabo una revisión bibliográfica acerca de los métodos empleados, se observa que existe una amplia variedad de técnicas analíticas para la determinación de muchos aditivos alimentarios sintéticos, entre ellos los edulcorantes.

Dentro de las distintas técnicas, existen diferencias entre los métodos empleados para la determinación de compuestos individuales o combinaciones de los mismos (Herrmannova et al., 2006). Gran cantidad de investigación y trabajo analítico acerca de los edulcorantes artificiales se ha centrado en poder medir su concentración en bebidas y alimentos, ya que muchas de las técnicas no son adecuadas para la determinación de más de un compuesto en mezclas simples o complejas. Uno de los principales problemas que presenta este último caso, es que los compuestos presentan propiedades muy diferentes entre ellos, y además es complicado evaluar el efecto de la composición de la matriz en el rendimiento analítico (Gao et al., 2013), (Shah & Jager, 2017), (Li et al., 2021), (Armenta et al., 2004), (Lim et al., 2013).

1.3.1. Pretratamiento de muestras

El pretratamiento y limpieza de las muestras es una etapa esencial para la determinación de los analitos y a menudo es la que más tiempo requiere. Consiste en aislar los analitos de interés de las matrices de los alimentos, además de eliminar las posibles interferencias co-extraídas, antes de que tenga lugar el análisis instrumental. Para determinar si una muestra contiene edulcorantes, así como las respectivas concentraciones, se requiere a veces una gran purificación del extracto. Existen diversas formas de preparación de muestras y extracción simultánea de los compuestos, que se combinan con operaciones de laboratorio como la centrifugación, microfiltración y dilución. No obstante, no se puede subestimar la importancia de esta etapa, ya que no todos los errores producidos en este paso pueden corregirse.

Los alimentos son matrices muy complejas debido a las grandes diferencias en su composición. Además, los edulcorantes están presentes en ellos a niveles de concentración relativamente elevados, por lo que suele ser necesario que las muestras se diluyan de manera significativa para poder obtener concentraciones que se encuentren dentro del rango lineal de respuesta. Existen diversos compuestos en los alimentos con polaridades similares a los edulcorantes, por lo que es muy difícil aislarlos de la matriz. Por ejemplo, los caramelos se pesan y se disuelven en agua y posteriormente las muestras se diluyen hasta obtener una concentración dentro del rango lineal del método. Las muestras de bebida se diluyen con agua o con fase móvil o se someten a ultrasonidos con el fin de eliminar los gases disueltos. En algunos casos, la preparación de muestra es mínima (Shah & Jager, 2017), (Tighrine et al., 2019).

La extracción líquido-líquido (LLE) se usa a veces como método simple y de bajo coste para extraer los analitos antes de los análisis instrumentales. Implica la adición de un disolvente orgánico a los alimentos, en el cual se extraen los edulcorantes. La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica reproducible que puede utilizarse para aislar edulcorantes en función de su afinidad por una fase estacionaria. De todas las técnicas, la SPE es la más utilizada para el pretratamiento de muestras líquidas (Shah & Jager, 2017), (George, Arora, Wadhwa, & Singh, 2010), (Gan et al., 2013).

Los disolventes orgánicos no polares inmiscibles en agua utilizados en la microextracción en fase líquida (LPME) tienen una constante dieléctrica baja y son relativamente pobres para la extracción de compuestos polares. Los disolventes miscibles en agua más polares, como acetona, acetonitrilo, etanol e isopropanol, que proporcionan solubilidad para compuestos polares a no polares, no se pueden utilizar para la extracción líquido-líquido convencional (LLE) o el método LLME. Sin embargo, si el disolvente se genera in situ y se produce una separación de fases adicional, se obtiene un sistema de dos fases. De esta forma, los analitos pueden moverse selectivamente de la fase acuosa a la fase orgánica polar. Este proceso, consistente en el aumento de la fuerza iónica, se denomina salazón y se aplica en la salazón combinada con la extracción líquido-líquido (SALLE). Recientemente, esta técnica se aplicó como un método de extracción / limpieza simple, rápido, económico, verde y benigno para la preparación de diversas muestras y extracción de diferentes compuestos (Tighrine et al., 2019).

1.3.2. Análisis instrumental

Como ya se ha mencionado, los edulcorantes artificiales presentan propiedades físicas y químicas significativamente diferentes. Debido a ello, es muy difícil desarrollar un método único para la separación y aislamiento de las interferencias de la matriz. Hace unos años, la técnica más habitual para la determinación de edulcorantes en muestras de alimentos era la cromatografía de capa fina (TLC). No obstante, este método presenta el inconveniente de que carece de especificidad y simplemente se produce una determinación cualitativa de algunos edulcorantes (Shah & Jager, 2017). Otras técnicas utilizadas son la espectrofotometría, cromatografía de líquidos (LC), cromatografía iónica (IC), cromatografía de gases (GC), o electroforesis capilar (CE) entre otros. No obstante, la mayoría precisan de mucho tiempo, utilizan equipos costosos, productos químicos nocivos, o no son adecuados para su uso en aplicaciones de rutina. Una alternativa, aunque también relativamente costosa, es la isotacoforesis capilar, que puede aplicarse en muestras con matrices complejas y presenta la ventaja de no necesitar pretratamiento alguno en el caso de analizar muestras líquidas, a excepción de la dilución y extracción con agua para muestras sólidas. Al llevarse a cabo en un medio

INTRODUCCIÓN

puramente acuoso, se considera un método bastante ecológico y económicamente rentable, lo que supone una gran ventaja (Herrmannova et al., 2006).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más usada en la actualidad. La mayor parte de los procedimientos se basan en la separación cromatográfica en fase inversa, isocrática o en gradiente, y la posterior detección de la absorbancia en la región ultravioleta del espectro. Una opción para ampliar los rangos de detección se encuentra en el acoplamiento de detectores multifuncionales. La técnica de HPLC junto con diferentes detectores, como ultravioleta (UV), detección de dispersión de luz por evaporación (ELSD) y espectrometría de masas (MS) se ha utilizado en el análisis de mezclas de edulcorantes (Gao et al., 2013), (Shah & Jager, 2017), (Li et al., 2021), (Armenta et al., 2004), (Lim et al., 2013)

En la mayoría de estudios llevados a cabo con HPLC para los edulcorantes artificiales se utilizan algunos disolventes tóxicos como acetonitrilo o metanol en la composición de la fase móvil. Debido a que estos disolventes no pueden liberarse en la naturaleza tras el análisis por la contaminación ambiental, su uso no es recomendable. Además, la purificación de los desechos obtenidos es muy costosa. Debido a ello, existen diversos métodos para reducir el uso de fases móviles tóxicas, como la cromatografía líquida micelar, la cromatografía líquida de ultra alta presión, la cromatografía líquida de alta temperatura (HTLC), la cromatografía en agua sobrecalentada, utilizando disolventes benignos ambientalmente en la fase móvil como etanol o agua pura entre otros, y métodos de análisis simultáneos o rápidos (Sik, 2012), (Üstün Özgür & Kasapoğlu, 2019).

Recientemente, se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con pares iónicos de fase inversa, cromatografía de interacción hidrófila e iónica (HILIC). Por el contrario, la cromatografía de gases se utiliza en pocas ocasiones debido a la baja volatilidad de los edulcorantes, así como la dificultad de formar derivados volátiles. La FDA ha utilizado cromatografía iónica (IC) acoplada a la detección de conductividad para la determinación de algunos edulcorantes. No obstante, se ha demostrado que carece de selectividad en algunas matrices, como las que contienen ácido cítrico, ya que proporciona una interferencia significativa que consiste un pico muy grande que puede afectar negativamente a las determinaciones. Además, el alcance del método es

INTRODUCCIÓN

limitado y no incluye todos los edulcorantes de interés reglamentario (Shah & Jager, 2017).

Otra alternativa al uso de HPLC se encuentra en la electroforesis capilar de zona (ZCE), donde todos los compuestos se pueden separar en un único análisis. Debido a ello, se han propuesto diversos métodos con esta técnica utilizando distintos tampones (Frazier, Inns, Dossi, Ames, & Nursten, 2000), (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009).

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación potente y flexible capaz de separar analitos de muestras de una variedad de clases de compuestos dentro de un solo análisis. Esta capacidad hace que sea una técnica ideal para el análisis de mezclas multicomponente como los refrescos. Debido a ello, se postula como una alternativa a HPLC con un poder de resolución comparable y presentando la ventaja de un bajo consumo de disolventes. Es un procedimiento rápido y sencillo que utiliza detección fotométrica en la región UV o detección de conductividad eléctrica. Para compuestos que no son susceptibles de detección UV por sus bajas propiedades cromóforas, como el ciclamato, la detección de conductividad es una buena alternativa. No obstante, no es tan utilizada como HPLC debido a su menor robustez (Shah & Jager, 2017), (Frazier et al., 2000).

Pese a que lo más habitual es la determinación de edulcorantes por HPLC, también se usan a menudo métodos espectrofotométricos. Hasta hace unos años, las normas europeas solo habían incluido un método espectrofotométrico y dos métodos HPLC-UV. En 1975, Nakamura describió un método fluorimétrico para la sacarina con longitud de onda de excitación a 277 nm y longitud de onda de emisión a 410 nm. No obstante, era lento, requería muchos pasos y calentamiento. Debido a que los métodos espectrofotométricos a menudo consumen demasiado tiempo, la HPLC en combinación con la detección ultravioleta (UV) se ha convertido en el método de elección para determinar la sacarina en las regulaciones internacionales. Además, presenta una elevada selectividad.

No obstante, existe un problema debido a que muchos componentes de bebidas que contienen sacarina, como ciertos aromas, eluyen a tiempos de retención similares a ella y absorben en las mismas longitudes de onda (214–217, 227–228, 254, 265 nm),

INTRODUCCIÓN

originando una pobre selectividad. Se han utilizado varias combinaciones de columnas, modificadores químicos y longitudes de onda para lograr la separación adecuada y eliminar las especies interferentes. Sin embargo, la mayoría de métodos generalmente se refieren y limitan a una serie de matrices.

Cuando cambia alguno de los parámetros anteriores, rara vez se logra una resolución aceptable. Por lo tanto, estos métodos no son adecuados para el análisis de una amplia gama de muestras de productos o matrices a menos que se realicen correcciones y los métodos se adapten a las nuevas condiciones. Sin embargo, realizar estos cambios es tedioso. Debido a ello, se planteó como alternativa la determinación de sacarina mediante un método HPLC-FLD altamente selectivo, que cuantificaba de manera inequívoca la sacarina en una amplia gama de productos (Bruno et al., 2014).

Otra opción, se corresponde con un método espectrofotométrico basado en la reacción de la sacarina con p-cloranil que da lugar a un compuesto rojo violeta. Los resultados coincidieron bastante con los obtenidos por el método HPLC recomendado por la FDA, lo que muestra el potencial de este método, que se usó para determinar sacarina o sacarina en combinación con ciclamato (Weinert, Pezza, Oliveira, & Pezza, 2004).

Existen múltiples procedimientos espectrofotométricos para determinar la concentración de aspartamo en disoluciones. Estos métodos incluyen reactivos que resultan peligrosos, y además suelen consumir mucho tiempo. Debido a ello, una alternativa se encuentra en un método colorimétrico rápido que aprovecha los cambios de color producidos cuando los iones de cobre (II) reaccionan con moléculas proteínicas. Estos experimentos muestran la utilidad de un reactivo de Biuret modificado para diferenciar e identificar disoluciones que contienen varios edulcorantes. El complejo azul que se obtiene tras la reacción del aspartamo con iones cobre (II) permite análisis cualitativos y cuantitativos de soluciones que contengan este compuesto. No obstante, hay que tener cuidado al analizar edulcorantes con reactivos a base de cobre (II), ya que un componente mayoritario habitual es la dextrosa, que reacciona fácilmente con el reactivo de Fehling. Si el pH de la solución se mantiene por debajo de 11, se ha visto que la dextrosa no interfiere en el análisis (Fenk, Kaufman, & Donald G. Gerbig, 2007).

La espectroscopía FT-Raman permite llevar a cabo mediciones directas en sólidos y se corresponde con una alternativa rápida y más respetuosa con el medio ambiente al eliminar el uso de disolventes y generación de residuos. Además, permite el almacenamiento y conservación de las muestras tras su análisis al tratarse de una técnica no destructiva. No obstante, presenta una gran desventaja ya que proporciona una sensibilidad muy baja en comparación con la técnica de HPLC, proporcionando límites de detección peores en contraste con los que se obtienen en HPLC, lo que hace que su uso no esté generalizado (Armenta et al., 2004).

El método analítico para el análisis de muestras ambientales debe ser más sensible debido al análisis de trazas o ultratrazas en el ambiente. La cromatografía líquida junto con la espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) se corresponde con el método más popular para ello debido a su gran precisión y sensibilidad. Otra opción, se corresponde con LC-ESI/MS en modo de ionización negativa, donde la ionización se mejora por la adición posterior a la columna de un modificador alcalino. Posteriormente, se modificó el método agregando el modificador alcalino en la fase móvil y el proceso de extracción en fase sólida para enriquecer y separar los analitos polares. No obstante, estos métodos requerían un par de iones o un modificador que daría efectos negativos en la detección espectrométrica de masas. De esta forma, la separación y la detección se convirtieron en proposiciones contradictorias. Con el fin de solventarlo, se desarrolló un método analítico para la determinación mediante cromatografía iónica-espectrometría de masas en tándem (IC-MS / MS) que resolvía dicha contradicción, y se propuso una extracción en fase sólida (SPE) que tenía un alto enriquecimiento de sustancias hidrófilas como son los edulcorantes artificiales (Gui et al., 2016), (Gan et al., 2013).

1.3.3. Detectores

Como ya se ha visto, los edulcorantes artificiales se determinan habitualmente por HPLC. Esta técnica, junto con diferentes detectores, como ultravioleta (UV), detección de dispersión de luz por evaporación (ELSD) y espectrometría de masas (MS) se ha utilizado en el análisis de mezclas de edulcorantes.

INTRODUCCIÓN

La técnica HPLC junto con la detección de matriz de diodos o UV es el método por excelencia debido a su gran resolución, selectividad y sensibilidad. En el caso del detector UV, lo esperable es que los analitos absorban en la región UV-Vis. No obstante, algunos como el ciclamato y la sucralosa no presentan grupos cromóforos, por lo que no se detectan habitualmente por esta técnica a no ser que se lleve a cabo un proceso de derivatización previo. Se ha descrito un método HPLC-UV que no precisa derivatización previa para la determinación de tres edulcorantes (ciclamato, sacarina y aspartamo) usando una separación y detección de fase inversa a 196 nm. Sin embargo, para lograr la resolución inicial del ciclamato y sacarina, el pH de la fase móvil debe mantenerse en 2,5, lo que podría comprometer la integridad de la columna. Además, muchos alimentos y bebidas contienen especies con actividad UV que podrían interferir con el análisis si no se logra la separación cromatográfica.

La técnica HPLC-ELSD se ha utilizado con éxito para separar y analizar cuantitativamente nueve edulcorantes que presentan absorbancias elevadas en alimentos. El ELSD se considera un detector semiuniversal porque su sensibilidad depende principalmente de la volatilidad de los analitos y las fases móviles, pero presenta la desventaja de que solo puede identificar los edulcorantes por el tiempo de retención y puede carecer de selectividad, sobre todo entre las interferencias en la matriz.

La espectrometría de masas (MS) es la técnica más eficaz cuando se busca obtener una cuantificación y detección simultánea en matrices complejas. Debido a ello, se exploran las técnicas HPLC/MS y HPLC-MS/MS, que proporcionan una elevada sensibilidad y especificidad y cuya selectividad permite una identificación y determinación precisa en matrices de alimentos a niveles de trazas, sin precisar de una derivatización previa ni mucho tiempo para el análisis. Esto ha hecho que se vuelvan muy utilizadas en el análisis de alimentos. La ionización de los analitos se consigue habitualmente mediante una interfase de electropulverización o electrospray (ESI) (Gao et al., 2013), (Shah & Jager, 2017), (Li et al., 2021), (Armenta et al., 2004), (Lim et al., 2013).

1.4. Concentraciones en el medio ambiente

Los edulcorantes artificiales son compuestos orgánicos ampliamente utilizados en todo el mundo como sustitutos del azúcar. Pese a ello, los datos de los que se dispone hasta ahora acerca de su comportamiento medioambiental son bastante limitados debido a su baja toxicidad. No obstante, recientemente han ido adquiriendo más atención debido a que según algunos científicos, algunos de los edulcorantes como el acesulfamo, presentan el potencial de ser el trazador ideal de aguas residuales domésticas (Gui et al., 2016).

Por otra parte, la ecotoxicología de los edulcorantes artificiales en organismos terrestres y acuáticos ha atraído recientemente una atención considerable debido a la presencia de éstos en el medio ambiente. Por norma general, la toxicidad de los edulcorantes artificiales en los organismos acuáticos es baja; sin embargo, se han visto algunos efectos negativos. Se ha descrito que el comportamiento de locomoción y la fisiología de los crustáceos pueden verse afectados cuando éstos se exponen a la sucralosa, así como la inhibición del transporte de sacarosa en la caña de azúcar debido a la presencia de este edulcorante. Un estudio posterior puso de manifiesto que la sucralosa no parece tener un efecto tóxico en el crecimiento de las plantas, pero se sugirió que la persistencia de este compuesto podría llevar a una exposición crónica a dosis bajas cuyas consecuencias son en gran parte desconocidas para la salud ambiental. Un estudio acerca del aspartamo pone de manifiesto que este compuesto influye de manera significativa en el comportamiento de natación del pez cebra, pudiendo llegar a causar su muerte en elevadas concentraciones. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, se aprecia que los posibles efectos ecotoxicológicos de los edulcorantes artificiales precisan aún de muchos más estudios.

Estudios recientes han determinado los niveles de concentración en que los edulcorantes artificiales se encuentran en el medio acuático. En países como Suiza y Alemania, se ha visto que la concentración de edulcorantes artificiales en aguas superficiales y residuales variaba desde varios cientos de ng/L a 50 µg/L para el caso del acesulfamo, de 0,08 µg/L a 9,1 µg/L en el caso de la sucralosa, de 0,18 µg/L a 50 µg/L en el caso de la sacarina, y de 0,13 µg/L a 190 µg/L para el ciclamato. La sucralosa también se encontró en aguas superficiales de otros países europeos, así como aguas marinas y

INTRODUCCIÓN

costeras en Estados Unidos. En estos casos, se encontraban en concentraciones de hasta 1 µg/L y 0,39 µg/L respectivamente. Debido a su persistencia y frecuente detección, se propuso que el acesulfamo y la sucralosa se utilizaran como indicadores de la influencia de las aguas residuales en las aguas receptoras. No obstante, todos estos estudios son relativamente escasos (Gan et al., 2013).

La vida media de la sucralosa en el agua es de varios años, lo que permitiría explicar las concentraciones encontradas en el medio acuático. Este compuesto no se altera en las plantas de tratamiento de aguas residuales y se encontraron concentraciones de hasta varios µg/L en los afluentes y efluentes de las plantas, y hasta varios cientos de ng/L en aguas superficiales en Suecia. Aumentando este estudio a escala de la Unión Europea, se observó que la sucralosa se detectó primordialmente en muestras de países de Europa occidental y Escandinavia; en países como Alemania y Europa del este, se encontraron concentraciones menores como las expresadas anteriormente (Scheurer et al., 2009).

1.5. Concentraciones en alimentos y bebidas

Existe una cierta controversia con respecto a los posibles efectos adversos para la salud de los edulcorantes artificiales. Se ha informado de efectos secundarios muy diversos relacionados con su consumo, desde cambios de humor y comportamiento, dolores de cabeza, alergias, irritaciones en la piel o dificultades respiratorias entre otros. Debido a ello, es importante controlar la concentración de dichos compuestos en los alimentos o refrescos con el fin de garantizar que se cumplan las distintas regulaciones específicas de cada país. La Unión Europea limita la cantidad de edulcorantes artificiales añadidos a los alimentos y establece una dosis máxima utilizable (MUD) para algunos productos alimenticios (Shah & Jager, 2017).

En la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos que determinen el contenido de edulcorantes en bebidas gaseosas, pero sí en otro tipo de bebidas o alimentos. Dichos contenidos varían en función del tipo de alimento o bebida, así como de un país a otro, ya que cada país fija unos límites, y los aditivos no deben sobrepasar dichos límites. Así, se encuentran algunos ejemplos en la Tabla 1. No se encontraron datos del ciclamato en estas muestras.

Tabla 1: : Concentraciones de los distintos edulcorantes en algunas muestras

Tipo de muestra	Concentración de edulcorantes			
	Aspartamo	Acesulfamo-K	Sacarina	Sucralosa
Chicles Orbit	10,9 - 24,4 mg/g	53,9 - 97,5 mg/g	-	-
Chicle Korea	394,1 ± 5,8 mg/kg	250,5 ± 4,2 mg/kg	-	-
Caramelos	14,9 mg/g	23,2 mg/g	-	-
Caramelos Korea	159,5 - 316,3 mg/kg	558,4 mg/kg	-	451,4 mg/kg
Cerveza	-	0,047 - 0,061 mg/L	-	42 - 48 mg/L
Licor blanco	-	-	0,027 mg/L	0,23 mg/L
Vino tinto	-	-	-	0,39 - 0,43 mg/L
Vino blanco	-	-	-	0,29 - 0,43 mg/L
Whiskey	-	-	-	48 mg/L
Cola light	31,83 - 409,92 mg/L	38,57 - 200 mg/L	25,47 - 161,4 mg/L	-
Lima Limón	173,6 mg/L	-	-	-
Bebida de uva	-	-	67,5 mg/100mL	-
Café	-	259,2 mg/L	-	-
Bebida de naranja	-	-	150 ppm	-
Bebida de limon	-	-	150 ppm	-
Supari	-	-	500 ppm	-
Bebida de Guaraná	-	-	42,2 - 63,2 mg/100 mL	-

1.6. Legislación

Los edulcorantes artificiales se corresponden con las grandes alternativas no calóricas a los azúcares como aditivos en alimentos y bebidas. No obstante, la lista de compuestos autorizados difiere de un país a otro. En Estados Unidos hay cinco edulcorantes artificiales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y son “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS): neotamo, acesulfamo K, sacarina, aspartamo y sucralosa. En la Unión Europea se encuentra aprobado también el ciclamato y otros como la neohesperidina dihidrochalcona (Scheurer et al., 2009), (Shah & Jager, 2017). En algunos países, como Estados Unidos entre otros, el uso del ciclamato no está permitido debido a su conversión en ciclohexilamina, un potente carcinógeno en el tracto gastrointestinal (Sastry, Srinivas, Prasad, & Krishnamacharyulu, 1995).

Las distintas regulaciones establecen un límite superior en la concentración de edulcorantes en alimentos y bebidas. Además, las etiquetas de dichos alimentos y bebidas, deben indicar todos los edulcorantes utilizados en su fabricación (Ferrer & Thurman, 2010).

Un ejemplo de ello sería el caso de la regulación mundial con respecto a las bebidas alcohólicas, que establece que los distintos edulcorantes (ACS-K, ASP, CYC, NEO, SAC y SCL) deben encontrarse en un rango de concentraciones entre 33 y 700 mg/kg (Li et al., 2021).

En 1972, la FDA se retractó del estatus “GRAS” de la sacarina debido los estudios que ponían de manifiesto su potencial carcinogénico en animales. A raíz de estos estudios, años después, en 1977, la FDA anunció su intención de prohibir la sacarina, pero no salió adelante y Canadá prohibió este compuesto. En Estados Unidos los productos que contenían sacarina debían etiquetarse con una advertencia de que “causa cáncer en animales de laboratorio”. Tras los estudios que aseguraban su seguridad, la sacarina se eliminó de la lista de potenciales carcinógenos en Estados Unidos y la FDA eliminó todos los requisitos de las etiquetas de los alimentos de advertencia en los productos que contienen sacarina (Weinert et al., 2004), (Scheurer et al., 2009).

INTRODUCCIÓN

Con el fin de garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores, la Comisión Europea, asesorada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), anunció tres Directivas sobre colorantes, edulcorantes y otros aditivos, en las cuales se fijaban los niveles máximos permitidos (MPL) con posteriores ajustes. La EFSA asigna también la ingesta diaria aceptable (IDA) de todos los aditivos alimentarios aprobados. Dicha cantidad se corresponde con una ingesta diaria durante toda la vida, sin que suponga un riesgo apreciable para la salud. Por tanto, los MPL se ajustan de tal forma que se evite una ingesta al consumidor superior a la IDA (Lino & Pena, 2010).

Así, nos encontramos un valor de IDA para cada compuesto. En el caso del ciclamato, la IDA se fijó en 11 mg/kg por el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la Organización Mixta para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), mientras que el Comité Científico de Alimentos de la Comisión Europea (SCFEC), fijó dicha cantidad en 7mg/kg (Armenta et al., 2004).

En el caso de la sacarina, en 1984 la IDA se fijó en 2.5 mg/kg de peso corporal (Bruno et al., 2014). Posteriormente, dicho valor se aumentó a 5 mg/kg en 1993 por el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA). Por el contrario, el Comité Científico de Alimentos de la Comisión Europea (SCFEC) estableció ese valor dos años después, en 1995 (Armenta et al., 2004).

Para el acesulfamo K, está establecido un valor de IDA en el rango de 0-15 mg/kg por el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (Tighrine et al., 2019). En el caso del aspartamo, dicho valor es algo superior, encontrándose en el rango de 0-40 mg/kg (Üstün Özgür & Kasapoğlu, 2019).

La primera agencia reguladora nacional que respaldó la seguridad de la sucralosa como edulcorante artificial fue la División de Protección de la Salud de Canadá en 1991. En 1998 la FDA aprobó su uso en numerosas categorías de alimentos y bebidas y un año después, esa aprobación se extendió a permitir su uso general en todos los alimentos, bebidas, suplementos dietéticos y alimentos médicos. En enero de 2004, la Unión Europea actualizó su Directiva sobre edulcorantes permitiendo el uso de la sucralosa (Ferrer & Thurman, 2010).

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las concentraciones máximas permitidas de los edulcorantes comentados en esta memoria por la Comunidad Económica Europea se muestran en la Tabla 2. Estos límites máximos están recogidos en el Diario Oficial de la Comunidad Europea (Comisión Europea, 2011) dentro del subapartado de bebidas aromatizadas en el que se encuentran las bebidas carbonatadas con gas, denominadas también, gaseosas:

Tabla 2: Concentraciones máximas permitidas de los edulcorantes en la CEE

Edulcorante	Dosis máxima permitida (en mg/L o mg/kg)
Acesulfamo K	350
Aspartamo	600
Ácido ciclámico y sus sales de sodio y calcio	250
Sacarina y sus sales de sodio, potasio y calcio	100
Sucralosa	300

Adicionalmente, se encuentra que para el ácido cítrico aparece la especificación “quantum satis”, es decir, no hay una concentración máxima regulada pues no se han considerado efectos secundarios con respecto a su consumo. El ácido cítrico es un componente habitual en las bebidas con gas.

1.7. Análisis multicomponente

El análisis multicomponente es un caso particular de la regresión lineal múltiple. La regresión lineal múltiple es similar a la regresión lineal excepto en que el número de variables independientes es mayor. En primer lugar, es preciso resaltar que es lo que se entiende por relación o ajuste lineal. La siguiente relación entre una respuesta η es lineal tanto con los parámetros β como con las variables independientes x :

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_m x_m$$

No obstante, la denominación lineal se refiere a la relación existente entre la respuesta y los parámetros β del modelo, y no a la relación entre la respuesta y la(s) variable(s) independiente(s). De esa manera la relación

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 / x_1 + \beta_2 \log x_2$$

también es lineal en los parámetros, pero sin embargo la relación

$$\eta = \beta_0 + \log(2x - \beta_1)$$

no es lineal.

En el análisis multicomponente se supone que existe linealidad frente a los parámetros del modelo y además que las señales son aditivas. Se denomina análisis multicomponente porque es útil para determinar simultáneamente varios componentes de una mezcla. Para una mezcla de m sustancias se requieren al menos $n = m$ determinaciones. Si $n = m$, se tiene un sistema exactamente determinado, y si $n > m$ el sistema está sobre-determinado y se obtiene una mayor precisión.

Un ejemplo sencillo es la determinación de sustancias por espectrofotometría UV-visible, cuando se cumple la ley de Beer. Se determina la Absorbancia a n longitudes de onda para una mezcla de m componentes, de tal forma que a cada longitud de onda i se tiene, debido a la aditividad de las absorbancias, la siguiente relación:

$$A_i = k_{i1} C_1 + k_{i2} C_2 + \dots + k_{im} C_m$$

INTRODUCCIÓN

que en notación matricial se expresaría

$$\mathbf{a} = \mathbf{K} * \mathbf{c}$$

$$(n,1) \quad (n,m) \quad (m,1)$$

La matriz **K** contienen las absorptividades de las m sustancias a las n longitudes de onda.

	Sustancia			
	1	2	...	m
λ_1	ϵ_{11}	ϵ_{12}	...	ϵ_{1m}
λ_2	ϵ_{21}	ϵ_{22}	...	ϵ_{2m}
...
...
λ_n	ϵ_{n1}	ϵ_{n2}	...	ϵ_{nm}

que pueden obtenerse de los espectros de los componentes puros mediante un calibrado lineal. Evidentemente, se precisan tantos calibrados como componentes tiene la muestra.

El uso de notación matricial favorece la comprensión intuitiva de la generalización del ajuste lineal a un mayor número de variables. Las concentraciones en la muestra se obtendrían mediante el siguiente cálculo matricial (UniversidaddeValladolid, 2020-2021)

$$\mathbf{a} = \mathbf{X} \mathbf{c}$$

$${}^T\mathbf{X} \mathbf{a} = {}^T\mathbf{X} \mathbf{X} \mathbf{c} = ({}^T\mathbf{X} \mathbf{X}) \mathbf{c}$$

$$({}^T\mathbf{X} \mathbf{X})^{-1} {}^T\mathbf{X} \mathbf{a} = ({}^T\mathbf{X} \mathbf{X})^{-1} ({}^T\mathbf{X} \mathbf{X}) \mathbf{c} = \mathbf{c}$$

$$\mathbf{c} = ({}^T\mathbf{X} \mathbf{X})^{-1} {}^T\mathbf{X} \mathbf{a}$$

En este trabajo se ha intentado aplicar el análisis multicomponente para la determinación de edulcorantes de forma sencilla a partir de absorbancia en la región del UV-Visible.

2. Objetivos

En el presente Trabajo Fin de Máster se definen los siguientes objetivos:

- Evaluar la utilización de una columna ODS convencional para la separación de acesulfamo K, sacarina, ciclamato, sucralosa y ácido cítrico mediante HPLC.
- Evaluar el análisis multicomponente mediante espectrofotometría ultravioleta-visible para la cuantificación de acesulfamo K, sacarina, ciclamato, sucralosa y ácido cítrico en bebidas gaseosas.
- Conocer la concentración de estos edulcorantes y ácido cítrico en varias bebidas gaseosas comercializadas mediante técnicas espectrofotométricas y HPLC con detección ultravioleta y fluorescente.

3. Procedimiento experimental

En el presente trabajo, se lleva a cabo el análisis de 4 gaseosas de diferentes marcas con el fin de determinar la cantidad de los edulcorantes presentes en ellas.

Todas las muestras se analizan mediante un equipo de HPLC con detección UV-Vis y fluorescente, en fase inversa, así como un espectrofotómetro UV-Vis y un espectrofluorímetro, este último solo para aquellas muestras que contienen sacarina, ya que se trata del único compuesto estudiado que presenta fluorescencia.

3.1. Muestras analizadas

Las muestras analizadas se corresponden con 4 gaseosas de distintas marcas que fueron compradas en establecimientos de alimentación. La Tabla 3 muestra las marcas y composición presentes en la etiqueta.

Tabla 3: Edulcorantes presentes en las gaseosas estudiadas

	Marca	Composición
Muestra 1	IFA	sacarina, ciclamato
Muestra 2	SCHUSS	sacarina, acesulfamo, ciclamato
Muestra 3	Carrefour	acesulfamo K, sucralosa
Muestra 4	El Corte Inglés	sacarina, ciclamato, aspartamo

Adicionalmente, en algunas gaseosas, se indica la presencia de ácido cítrico y otros aromas no especificados.

3.2. Reactivos y material

Se ha utilizado el siguiente material y reactivos:

- Material
 - Matraces aforados, pipetas graduadas y otro material de vidrio de uso general.
 - Filtros de preparación de muestra de 0,45 µm de tamaño de poro.
 - Cubetas de cuarzo para el espectrofotómetro UV-Vis y espectrofluorímetro
- Reactivos
 - Patrones sólidos de sacarina, acesulfamo K, sucralosa y ciclamato sódico de pureza cromatográfica (mínimo 99%) suministrados por Sigma-Aldrich
 - Citrato sódico.
 - HCl concentrado y ácido fórmico obtenidos de Panreac
 - Acetonitrilo calidad HPLC suministrado por Scharlau
- Equipos
 - Equipo de cromatografía HPLC con bomba cuaternaria, sistema de desgasificación e inyector manual Agilent 1100
 - Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453
 - Espectrofluorímetro HITACHI F-3000
 - Equipo de obtención de agua desionizada
 - Balanza analítica Mettler
 - Equipo de ultrasonidos Selecta

3.3. Preparación de patrones y línea de calibrado

Las disoluciones madre de los patrones (edulcorantes y citrato) se prepararon individualmente por pesada. A tal fin, se pesaron los miligramos necesarios de cada compuesto y se disolvieron en 25 mL de H₂O desionizada para obtener una concentración nominal del orden de 800 mg/L.

De las disoluciones madre individuales de sacarina y acesulfamo K de 800 mg/L, se cogen 5 mL de cada una y se llevan a un matraz de 25 mL que se enrasa con H₂O. De esta forma se obtiene un patrón mixto de sacarina y acesulfamo K de 160 mg/L. A partir de él se realizan una serie de diluciones que se utilizarán para el calibrado posterior en HPLC. Estas diluciones se llevan a cabo tomando 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 mL del patrón de 160 mg/L, y llevándolo a un matraz de 10 mL que se enrasa con H₂O.

A partir de las disoluciones madre de los patrones, se preparan también diluciones individuales de ciclamato y citrato para hacer calibrados de adiciones patrón mediante espectroscopía UV-Vis. Para ello, se cogen 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 mL de la disolución de 800 mg/L y se llevan a un matraz 10 mL, que se enrasa con H₂O.

A partir de la disolución madre de sacarina, se lleva a cabo una dilución 1:10 y, a partir de ella, se realizan 6 diluciones que se utilizarán posteriormente para el calibrado por fluorescencia. Para ello, se toman 0,1, 0,25, 0,4, 0,5, 0,6 y 0,75 mL del patrón diluido (82 mg/L) y se llevan a un matraz de 10 mL que se enrasa con HCl 0,01 M. De esta forma se obtienen 6 patrones con concentraciones entre 0,8 y 6 mg/L.

Por último, indicar también que se realizaron otras mezclas similares de los analitos, enrasando con H₂O o HCl 0,01 M para poner a punto los métodos de análisis.

3.4. Preparación de muestra

En este caso, la preparación de las muestras es muy sencilla. Las gaseosas son bebidas carbonatadas, por lo que es preciso desgasificarlas antes de llevar a cabo el análisis. Esto se lleva a cabo en el equipo de ultrasonidos durante unos minutos.

Posteriormente, solo es necesario la dilución de las muestras hasta conseguir que las concentraciones de los compuestos se encuentren en el rango lineal del método. Dichas diluciones varían en función de la técnica, encontrándonos diluciones 0,1:10 para el método de adiciones patrón, diluciones 2:10 o 5:10 para el método HPLC en función de la muestra, diluciones 0,4:10 para el método de fluorescencia, y diluciones 1:4 para el estudio del análisis multicomponente. Las diluciones se realizan con agua o HCl 0,01 M según la técnica de análisis

3.5. Determinación de los edulcorantes

Para llevar a cabo la determinación de los distintos edulcorantes y ácido cítrico se han estudiado las posibilidades de 3 técnicas instrumentales: la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa acoplada a un detector UV y a un detector de fluorescencia en serie, la espectroscopía UV-Vis y la espectrofluorimetría. Los parámetros de operación propuestos para el análisis de determinados analitos mediante cada técnica se exponen a continuación. La sucralosa no pudo ser determinada debido a su muy baja absorbancia

3.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

La determinación de sacarina y acesulfamo K se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescente. La separación de los compuestos se llevó a cabo en fase inversa. Con respecto a la cromatografía de líquidos hay una serie de parámetros de operación que se han fijado tras una serie de pruebas y se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros cromatográficos

Columna	ODS
	Longitud: 15 cm
	Diámetro interno: 4,6 mm
	Diámetro de partícula: 5 μ m
Fase móvil	Método isocrático con la siguiente composición: - 10% ACN - 90% Ácido Fórmico
	Flujo: 1,0 mL/min
	Volumen de inyección: 20 μ L

El detector UV-Vis se fijó a una longitud de onda de $\lambda = 227$ nm hasta el minuto 4, para la detección del acesulfamo K, y a partir de ahí $\lambda = 203$ nm para la detección de la sacarina.

El detector de fluorescencia se fijó a una $\lambda_{ex} = 225$ nm y una $\lambda_{em} = 425$ nm

En la Tabla 5 se muestran los tiempos de retención de los dos compuestos determinados por HPLC, sacarina y acesulfamo K para el método isocrático de trabajo.

Tabla 5: Tiempos de retención de sacarina y acesulfamo K

Compuesto	Tiempo de retención
Sacarina	4,45 min
Acesulfamo K	3,20 min

Para determinar los edulcorantes en las muestras, es preciso diluirlas primero hasta que las concentraciones de los compuestos se encuentren dentro de los límites del calibrado llevado a cabo. Para ello, fue necesario una dilución 2:10 de las muestras

1, 3 y 4. Por el contrario, en el caso de la muestra 2, fue necesaria una dilución menor, 1:2, con el fin de que las concentraciones de los compuestos se encontraran en una zona más centrada del calibrado.

3.5.2. Espectroscopía UV-Vis

- Adiciones patrón

La determinación de ciclamato y citrato se llevó a cabo mediante espectroscopía UV-Vis con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453 equipado con una lámpara de deuterio y otra de wolframio.

La sucralosa se estudió, pero debido a que carece de grupos cromóforos, su detección no fue posible al no diferenciarse del fondo. Por el contrario, el citrato, pese a no ser un edulcorante, se estudió debido a su presencia en la mayoría de las gaseosas.

La determinación del citrato y ciclamato se llevó a cabo finalmente mediante un calibrado de adiciones patrón individual para cada compuesto. Para ello, se tomaron 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 mL de las disoluciones madre, y se llevaron a matraces de 10 mL, que se enrasaron con H₂O. Cada una de las diluciones presentaba la misma cantidad de la gaseosa, 0,1 mL.

- Análisis multicomponente

Se prepararon mezclas de los compuestos a determinar en diferentes concentraciones y proporciones, y se realizaron medidas de absorbancia en la zona del UV en la que absorben los compuestos, entre 200 y 300 nm. También se calculó la absorptividad de los analitos a estas longitudes de onda mediante la realización de calibrados individuales.

Después de varios experimentos previos, se comprobó que no era posible el análisis conjunto de la mayoría de los analitos que se pretendían analizar. Sólo se pudo determinar finalmente la concentración de sacarina y acesulfamo K mediante este procedimiento. Para ello, se determinaron las absorptividades a las longitudes de onda de 250, 255, 260, 265 y 270 nm con el fin de construir la matriz de coeficientes "K". las

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

absorbancias de las muestras de gaseosa, diluidas, a estas longitudes de onda constituyen el vector de absorbancias "a".

3.5.3. Fluorescencia

La determinación de sacarina también se llevó a cabo mediante fluorescencia con el fin de comparar los resultados obtenidos. La sacarina era el único compuesto estudiado que presentaba fluorescencia. Para ello, se utilizó un espectrofluorímetro HITACHI F-3000 equipado con una lámpara de xenón y cuyos parámetros principales son los siguientes:

- Longitud de onda de excitación $\lambda_{ex} = 220 \text{ nm}$
- Longitud de onda de emisión $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$
- Tiempo de respuesta: 2 s

Para la determinación de las muestras se realiza una dilución 0,4:10 usando HCl 0,01 M para enrasar.

4. Resultados y discusión

4.1. Espectros de los compuestos en H₂O y HCl

En primer lugar, se obtuvieron los espectros UV de los distintos edulcorantes, así como del citrato, tanto en H₂O como en HCl 0,01 M a una concentración en torno a 8 mg/L.

A continuación, se muestran los distintos espectros: Figuras 7 y 8 acesulfamo K, Figuras 9 y 10 ciclamato, Figuras 11 y 12 sacarina, Figuras 13 y 14 sucralosa, y Figuras 15 y 16 citrato.

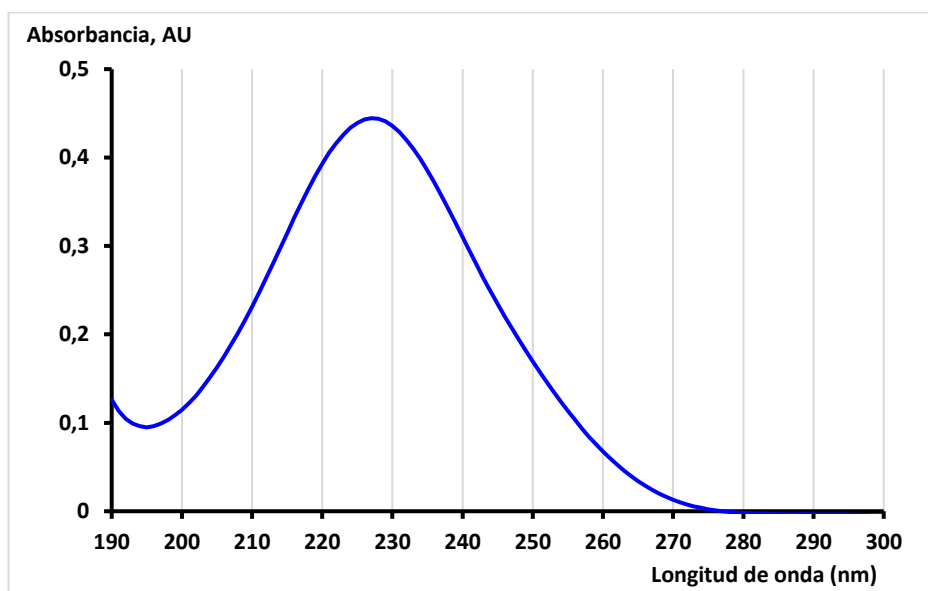


Figura 7: Espectro UV del Acesulfamo K en agua

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

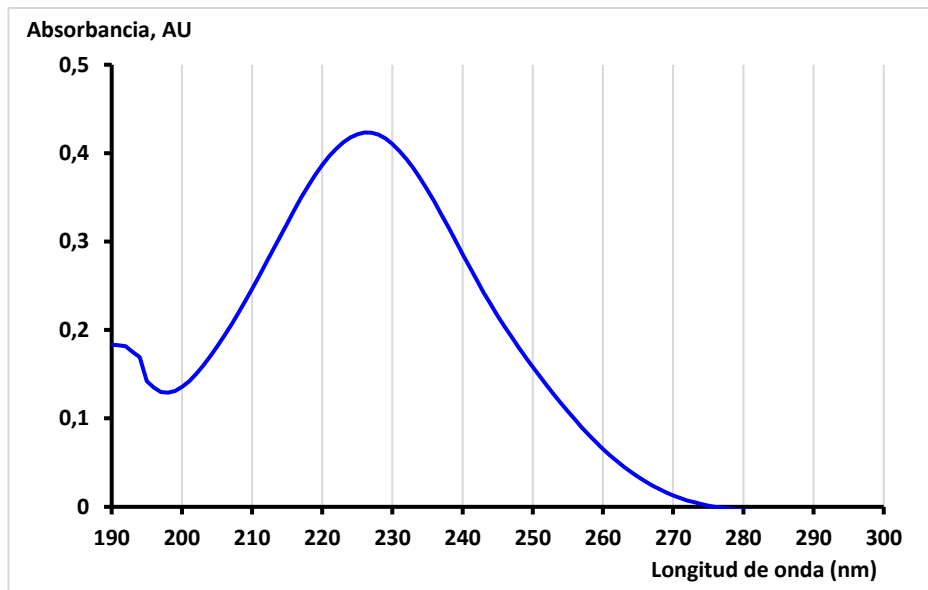


Figura 8: Espectro UV del Acesulfamo K en HCl

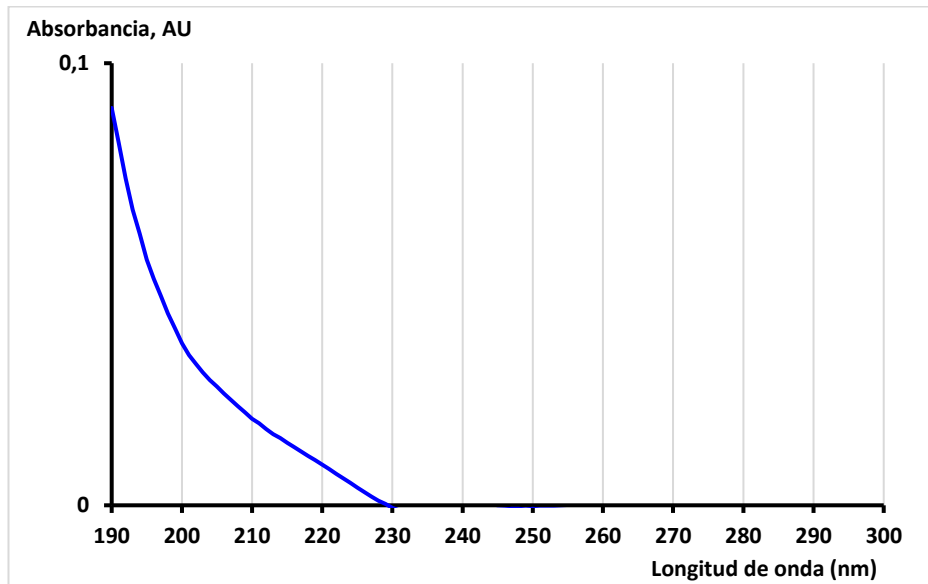


Figura 9: Espectro UV del ciclamato en agua

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

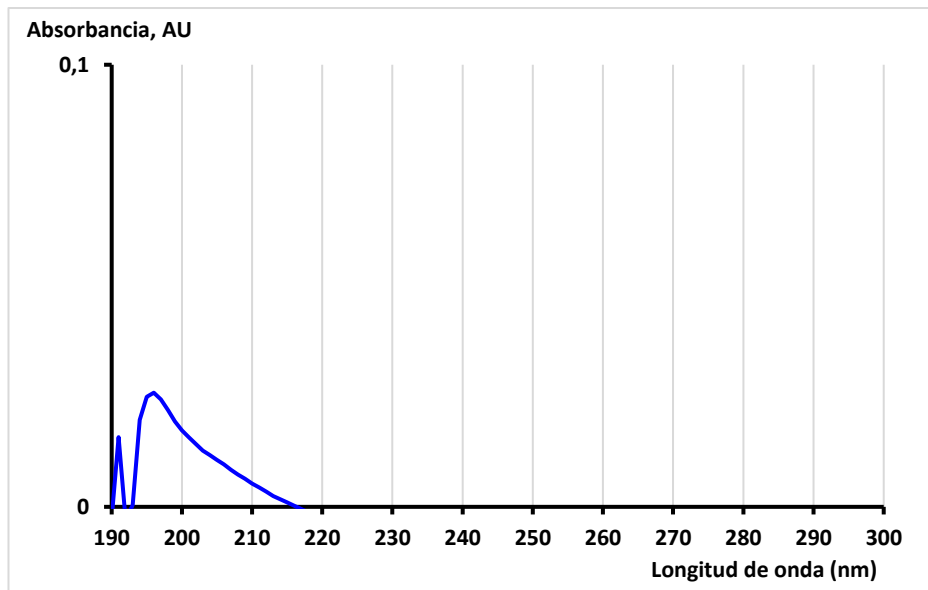


Figura 10: Espectro UV del ciclamato en HCl

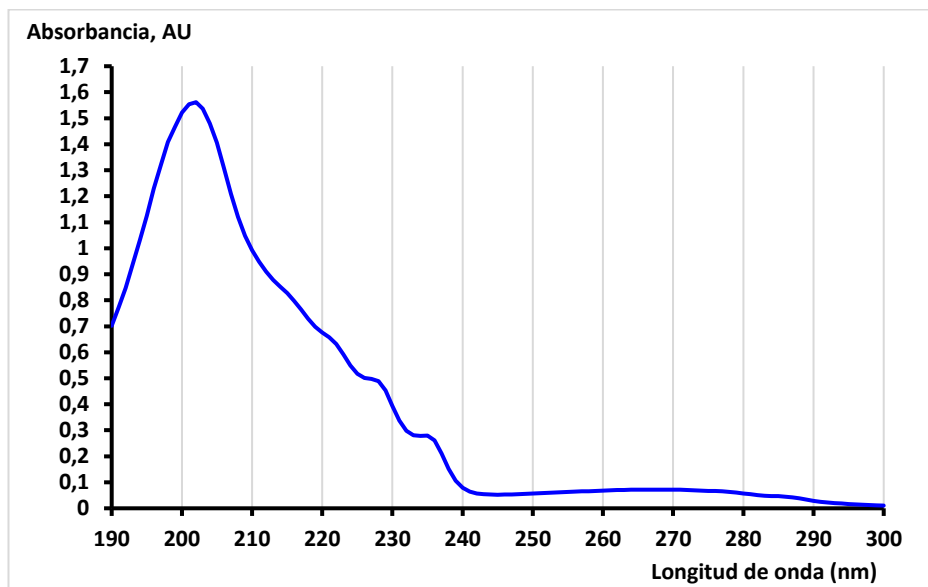


Figura 11: Espectro UV de la sacarina en agua

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

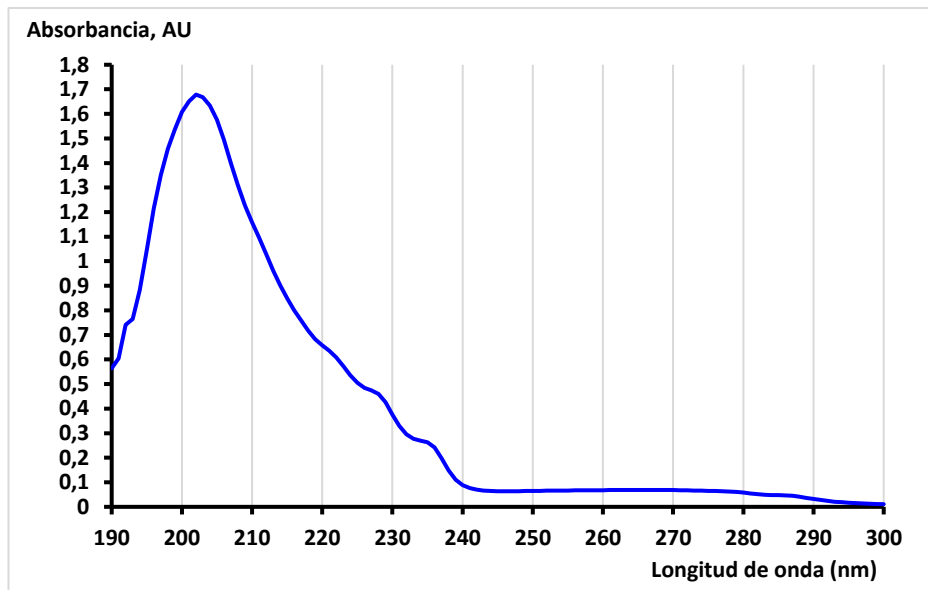


Figura 12: Espectro UV de la sacarina en HCl

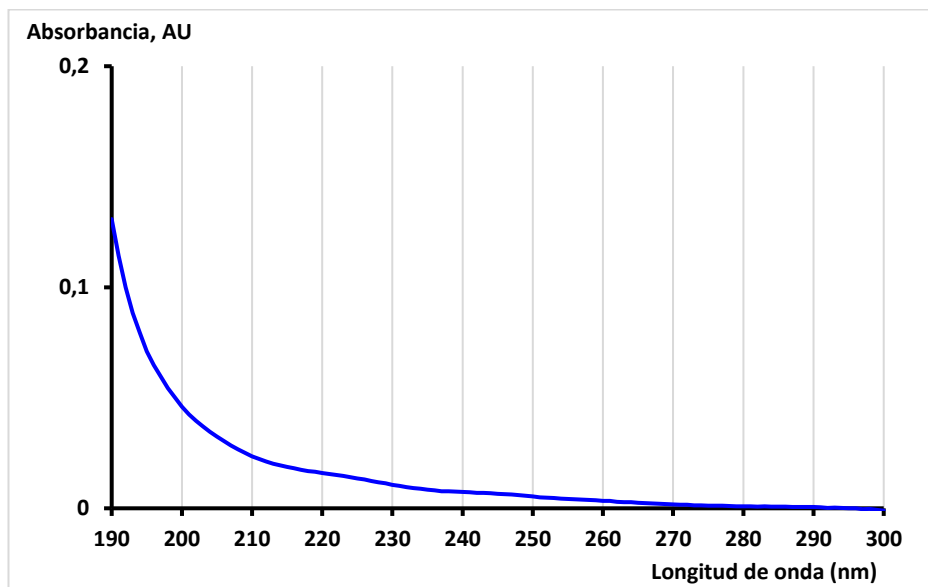


Figura 13: Espectro UV de la sucralosa en agua

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

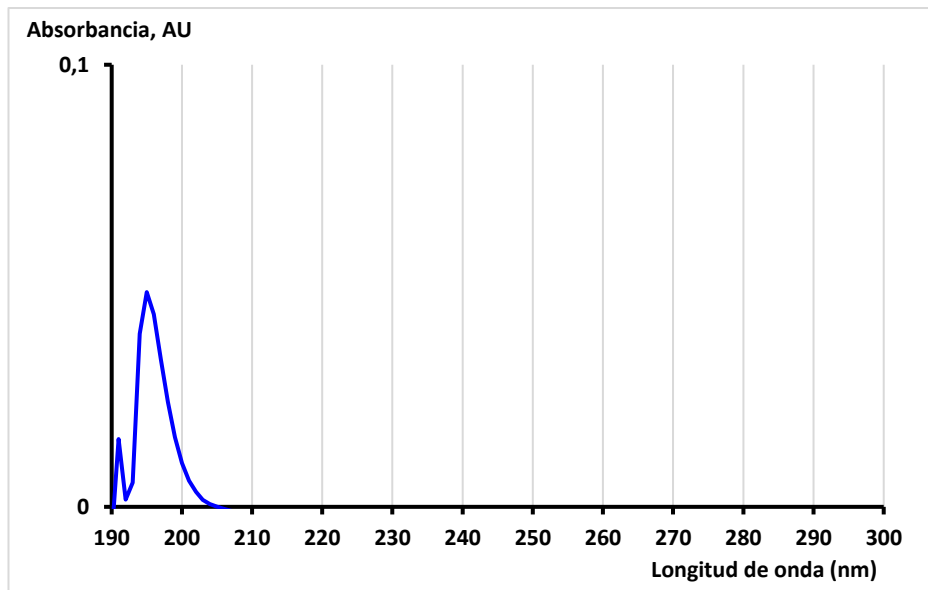


Figura 14: Espectro UV de la sucralosa en HCl

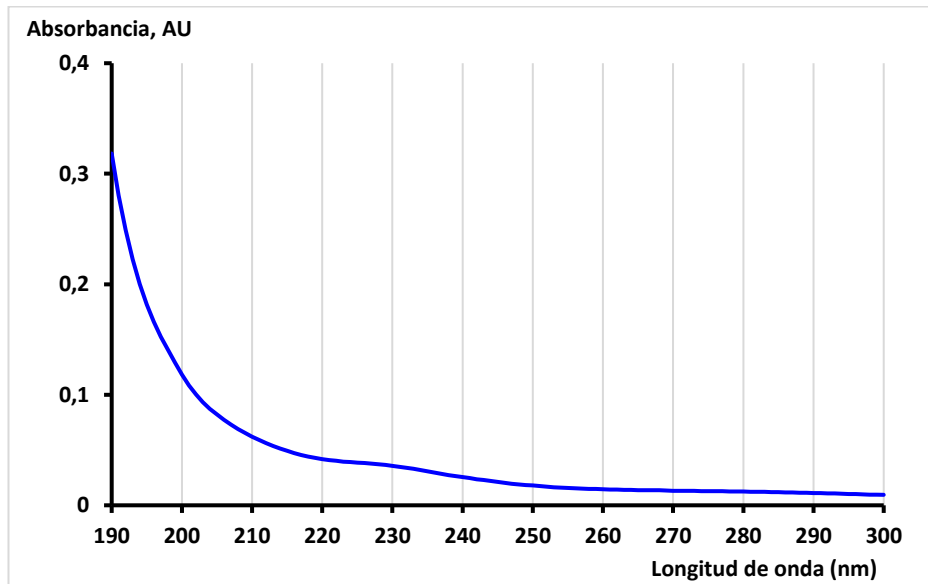


Figura 15: Espectro UV del citrato en agua

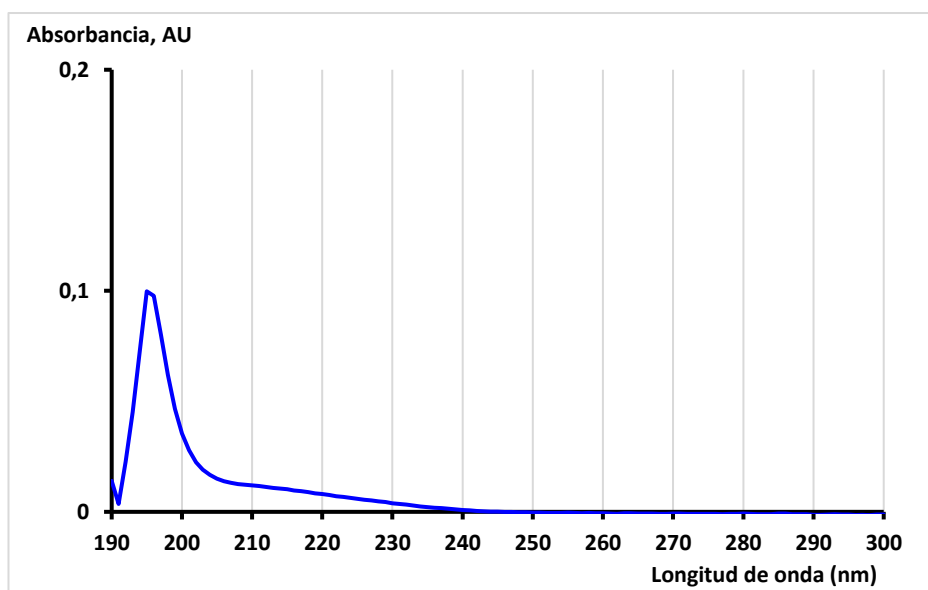


Figura 16: Espectro UV del citrato en HCl

A la vista de los espectros, se puede ver que en el caso de especies como el acesulfamo K o la sacarina, que absorben notablemente en la región del UV, no se aprecian grandes diferencias en los espectros obtenidos en medio agua o en medio HCl. Por el contrario, en el caso de los compuestos que absorben menos, como el ciclamato y el citrato, se obtienen absorbancias más altas usando agua como diluyente.

Observando el espectro de la sucralosa en HCl, se observa que presenta una absorbancia muy pequeña y, tras diferentes pruebas, no se conseguía mejorar los resultados obtenidos. Por este motivo, junto con su presumiblemente pequeña concentración en las bebidas a analizar, no se ha logrado su detección mediante ninguna de las técnicas y procedimientos ensayados y a partir de ahora, no nos referiremos a ella.

Se observan algunas diferencias entre los espectros en H₂O y HCl. En los espectros obtenidos en medio HCl se aprecia en algún caso la banda en forma de pico en la zona inicial de 190 nm y una caída abrupta de la banda de absorción del analito. Esto se atribuye a la presencia de cloruros, que absorben predominantemente a λ menores de 200 nm, que es donde se produce la caída.

Dado que el pH influye en mayor o menor medida en los espectros, y que las muestras de gaseosa son ácidas (pH próximo a 3), se ha optado por hacer

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

preferentemente las diluciones con HCl para igualar el pH de las muestras y patrones, lo que es importante en las medidas espectrofotométricas.

Analizando los espectros de cada compuesto a pH ácido, se puede ver que la zona de máxima absorción del acesulfamo K se encuentra en torno a $\lambda = 220-230$ nm, más concretamente a $\lambda = 227$ nm. En el caso del ciclamato, se observa que la zona de máxima absorción se encuentra en torno a $\lambda = 195-200$ nm (ácido ciclámico), más concretamente a $\lambda = 197$ nm. En el caso de la sacarina, se observa que la zona de máxima absorción se encuentra en torno a $\lambda = 200-205$ nm, más concretamente a $\lambda = 203$ nm. Finalmente, en el caso del ácido cítrico, se observa que la zona de máxima absorción se encuentra en torno a $\lambda = 190-195$ nm.

En la Tabla 6 se muestran los valores de pK_a de los distintos compuestos estudiados. Los valores, bajos en algunos compuestos, ponen de manifiesto la importancia de controlar el pH de las medidas.

Tabla 6: pK_a de los compuestos estudiados

Compuesto	pK_a
Sacarina	1,35
Acesulfamo K	3,02
Sucralosa	12,52
Ácido ciclámico	1,71
Ácido cítrico	3,15 / 4,77 / 6,40

4.2. Espectros de las gaseosas

Posteriormente, se registraron los espectros de las 4 gaseosas estudiadas. Para ello, fue necesario una dilución previa, para lo cual se tomaron 1 mL de cada gaseosa y se enrasaron en matraces de 10 mL con HCl 0,01 M.

A continuación, se muestran los distintos espectros, correspondiéndose la Figura 17 con el espectro de la Muestra 1, la Figura 18 con el espectro de la Muestra 2, la Figura 19 con el espectro de la Muestra 3 y la Figura 20 con el espectro de la Muestra 4.

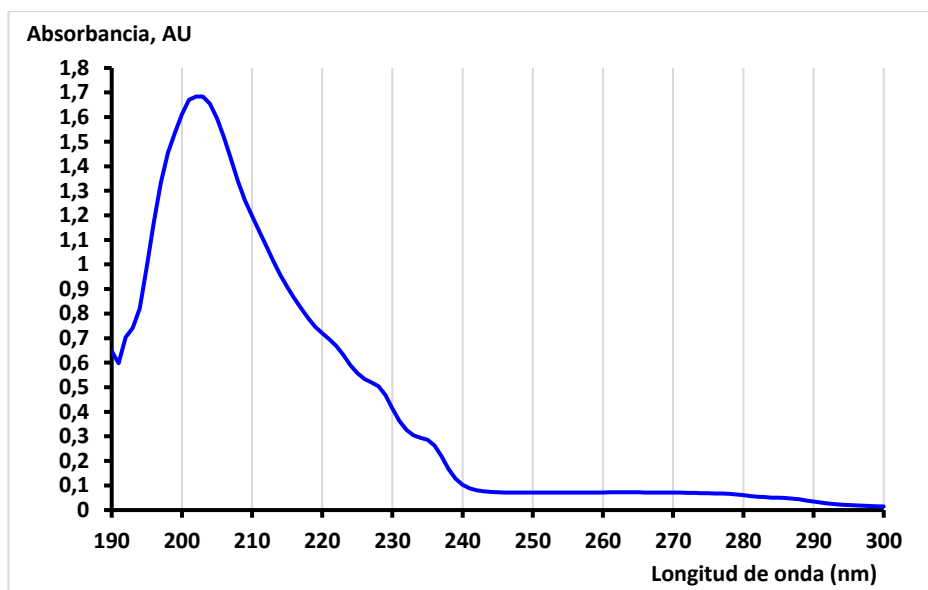


Figura 17: Espectro UV de la Muestra 1

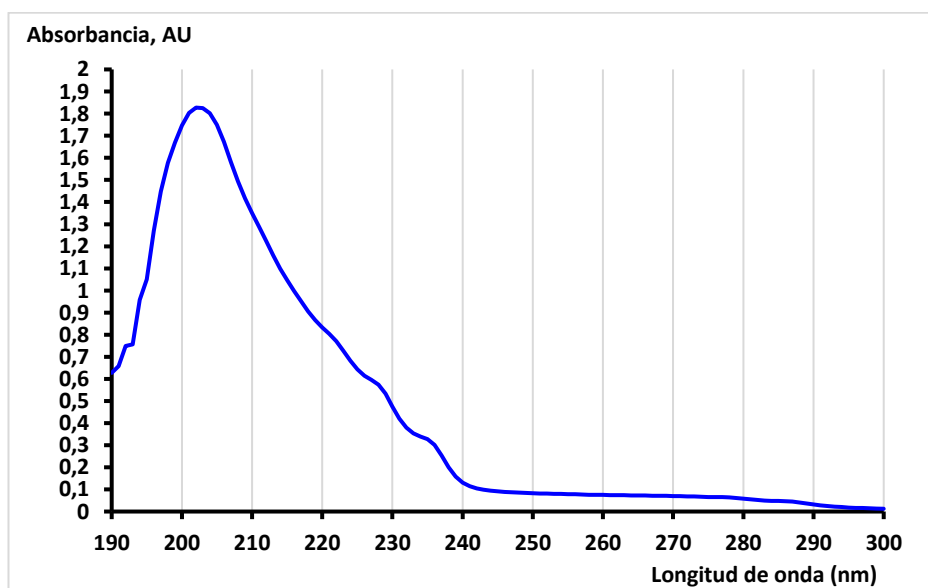


Figura 18: Espectro UV de la Muestra 2

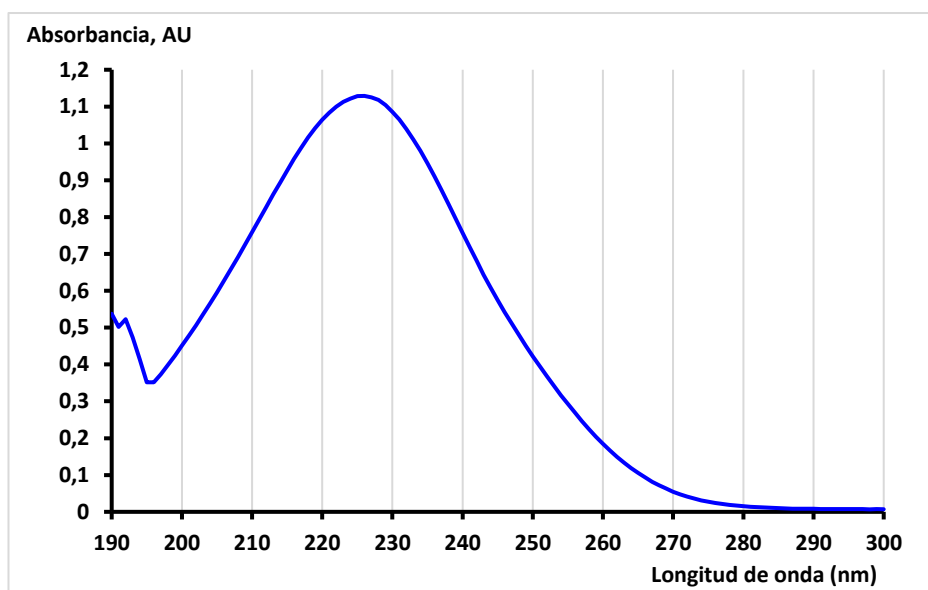


Figura 19: Espectro UV de la Muestra 3

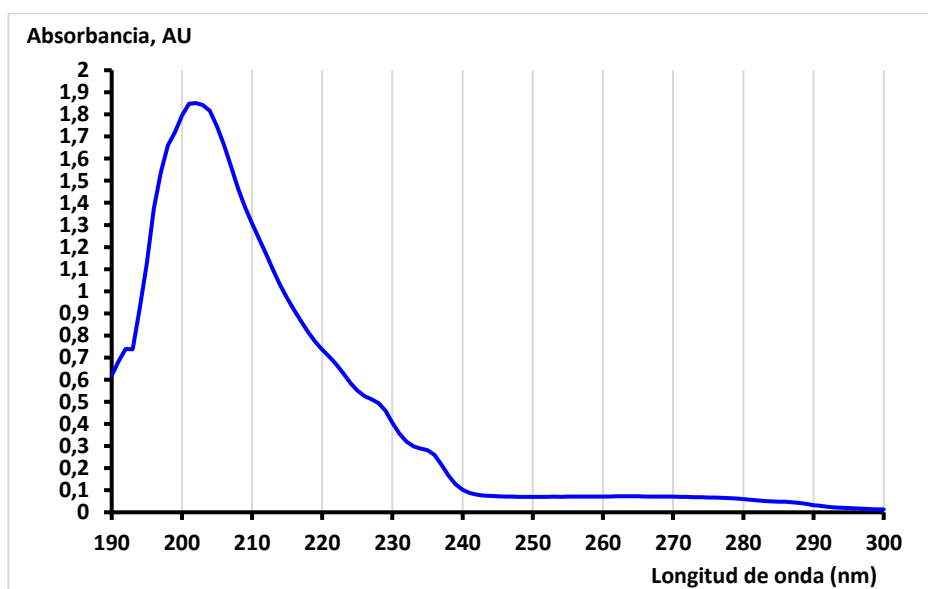


Figura 20: Espectro UV de la Muestra 4

A la vista de los espectros obtenidos, se observa que los correspondientes a las Muestras 1, 2 y 4, son muy similares entre sí y difieren de manera notable con el espectro de la Muestra 3. Esto puede explicarse debido a que las tres primeras muestras contienen sacarina en su composición, compuesto que, como ya se ha visto anteriormente, presenta una gran absorbancia en el UV en la zona cercana a 200 nm. Por el contrario, la Muestra 3 no presenta sacarina pero sí acesulfamo K, lo que explica que el pico se encuentre desplazado hacia 220-230 nm, zona en la cual se encuentra la máxima absorción del acesulfamo K.

4.3. HPLC

4.3.1. Ensayos previos

Para el análisis cromatográfico por HPLC se fijaron las condiciones anteriormente descritas en la Tabla 4 con un pH ácido. Si esto no se lleva a cabo y se trabaja con una fase móvil a pH neutro, los picos salen desdoblados, como se ve en la Figura 21. Para dicho cromatograma se utilizó una fase móvil ACN/H₂O. Esto pone de manifiesto el comportamiento ácido-base de los edulcorantes presentes, así como la necesidad de fijar el pH.

En los estudios previos se puso de manifiesto que el ácido cítrico y el ciclamato eluían en el frente cromatográfico. El uso de una fase móvil 100 % acuosa, a pH ácido, no permitía tampoco su separación adecuada, razón por la cual no se pudieron determinar mediante esta técnica y se recurrió al método de adiciones patrón.

En la Figura 22 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar la Muestra 1 diluida dopada con citrato. Se observa un aumento de la altura de un pico eluído en el frente. Las condiciones en las que se llevó a cabo este cromatograma fue $\lambda = 200$ nm, y el siguiente gradiente:

- Inicialmente 1 % de ACN y 99 % de ácido fórmico
- Hasta el minuto 1 se mantienen dichas condiciones
- Hasta el minuto 5 se aumenta el porcentaje de ACN hasta alcanzar un 50 %
- En el minuto 8 se alcanza un porcentaje de ACN de 80 % y 20 % de ácido fórmico
- En el minuto 8,5 se vuelven a las condiciones iniciales (1 % ACN y 99 % ácido fórmico)

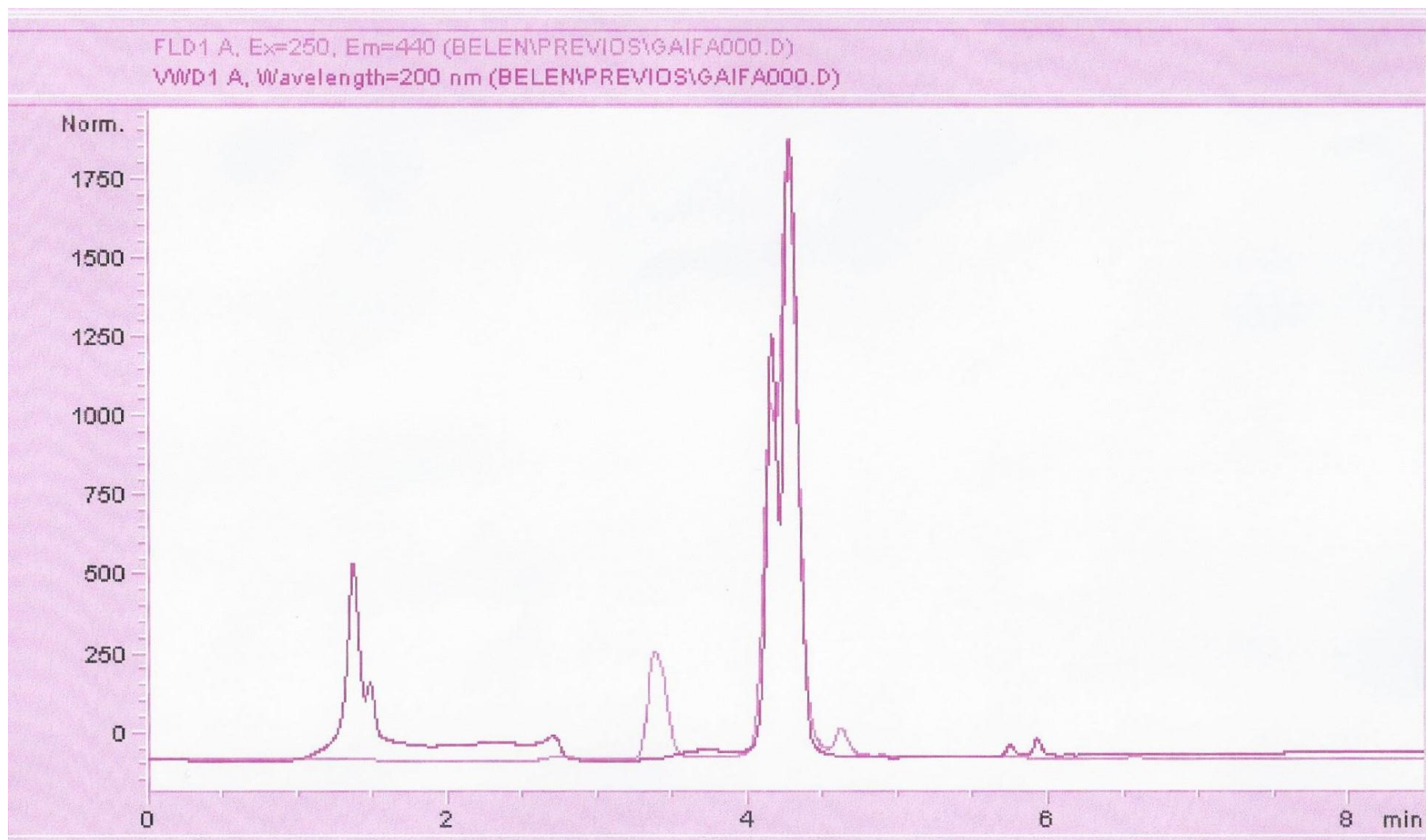


Figura 21: Cromatograma de la Muestra 1 con fase móvil acuosa

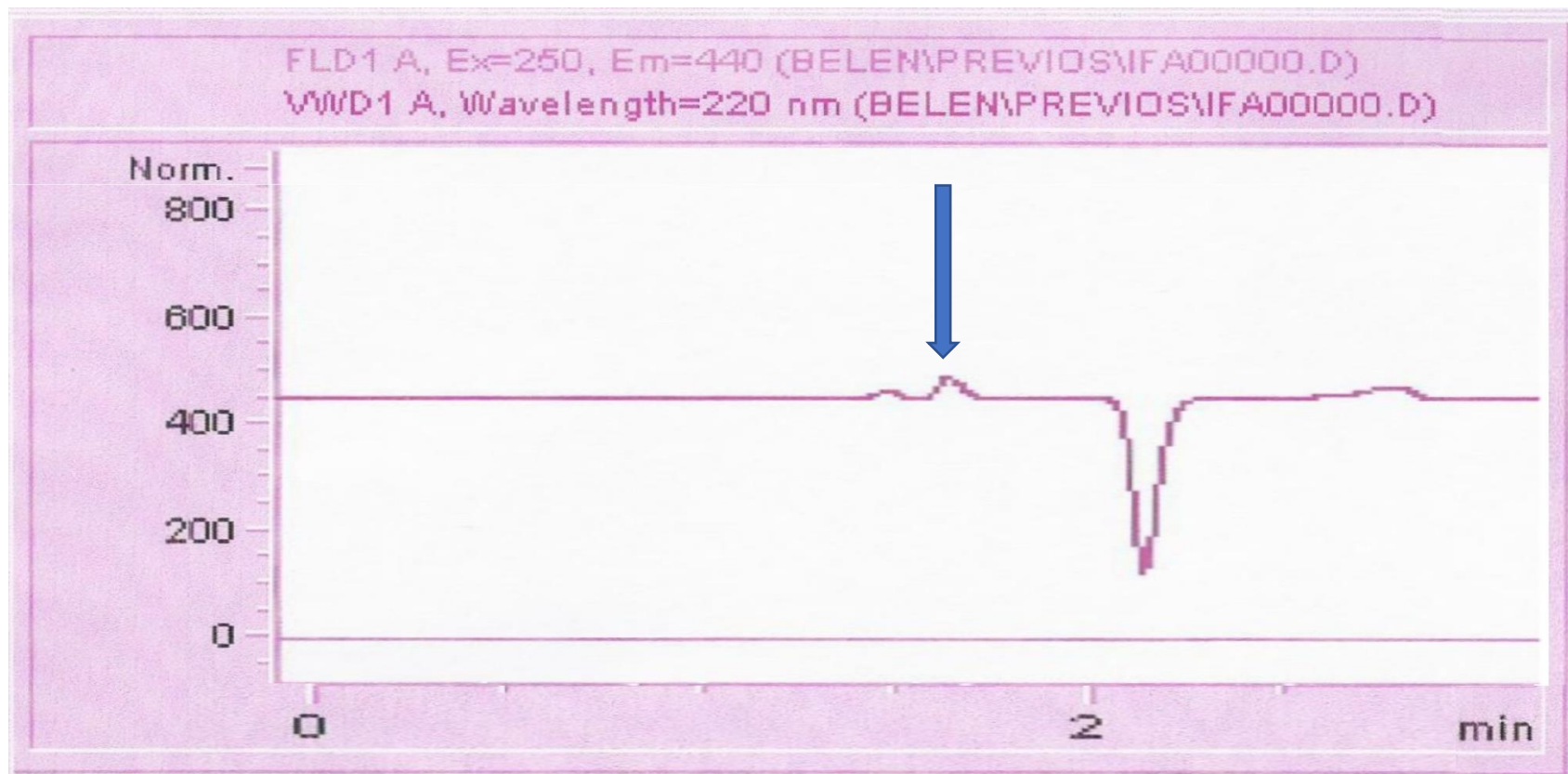


Figura 22: Cromatograma de la Muestra 1 diluida dopada con citrato

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ciclamato, compuesto de bajo peso molecular y relativamente polar, se supone que eluye también en el frente cromatográfico, porque después de su inyección en elevadas concentraciones y con detección a 200 nm (máxima absorptividad) no se observó ningún pico cromatográfico.

4.3.2. Análisis de muestras

Como ya se ha mencionado anteriormente, se determinan solo la sacarina y el acesulfamo K mediante este método.

La Figura 23 muestra la línea de calibrado obtenida para la sacarina a partir de los patrones mixtos con un intervalo de concentraciones que oscila entre 1,64 y 82 mg/L. Este calibrado se obtiene con los datos obtenidos por el detector UV del equipo de HPLC. Se determinaron los límites de detección y cuantificación llegando a un valor de 0,4 mg/L para la detección y 1,4 mg/L para la cuantificación. Los límites de detección y cuantificación se calcularon como 3,29 y 10 veces la relación que existe entre el error típico del ajuste y la pendiente del calibrado ($K \cdot S_e / b_1$), calculando estos parámetros con los tres puntos del calibrado de menor concentración ya que de esta manera se obtiene una mejor estimación de estos valores.

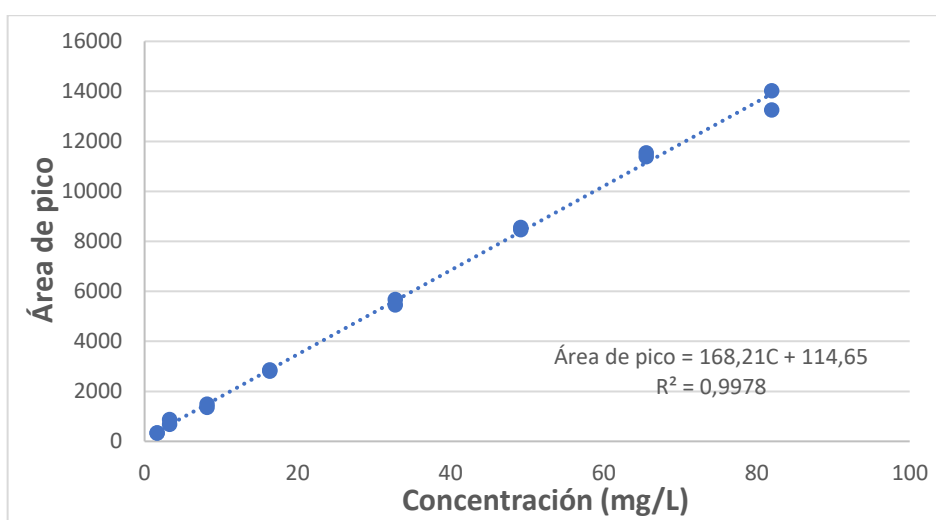


Figura 23: Línea de calibrado en HPLC para la sacarina con el detector UV (n=2)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 24 muestra la línea de calibrado obtenida para la sacarina a partir de los patrones disueltos del patrón mixto con un intervalo de concentraciones que oscila entre 1,64 y 82 mg/L. Por el contrario, en este calibrado, los datos se obtienen a partir del detector de fluorescencia del equipo de HPLC. Se determinaron los límites de detección y cuantificación llegando a un valor de 0,5 mg/L para la detección y 1,5 mg/L para la cuantificación.

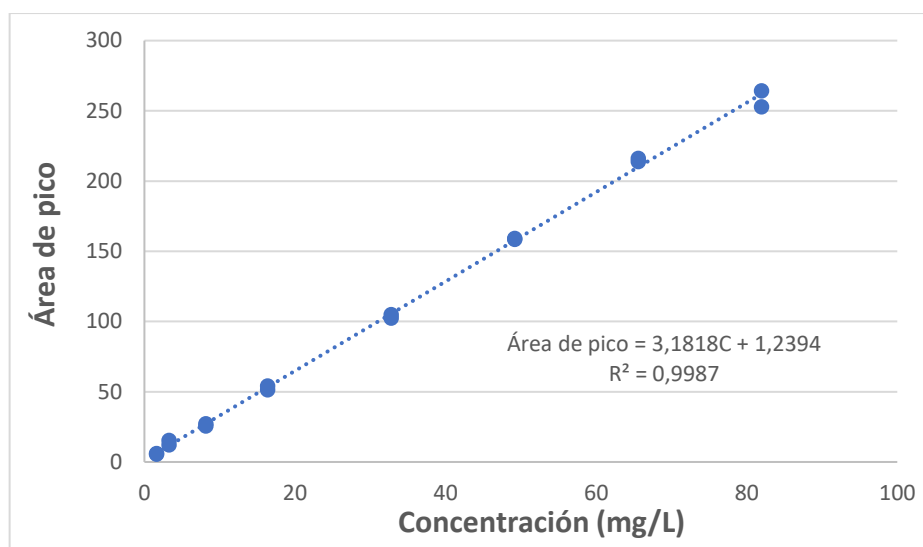


Figura 24: Línea de calibrado en HPLC para la sacarina con el detector FL (n=2)

De igual forma, la Figura 25 muestra la línea de calibrado obtenida para el acesulfamo K a partir de los patrones disueltos del patrón mixto con un intervalo de concentraciones que oscila entre 1,62 y 81,2 mg/L. Este calibrado se obtiene con los datos obtenidos por el detector UV del equipo de HPLC. Se determinaron los límites de detección y cuantificación llegando a un valor de 0,3 mg/L para la detección y 1 mg/L para la cuantificación.

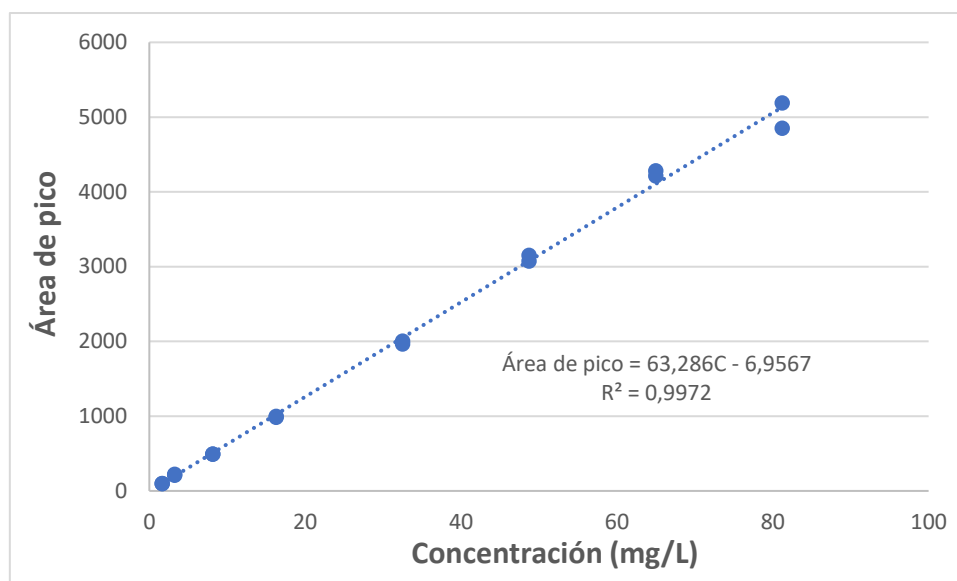


Figura 25: Línea de calibrado en HPLC para el Acesulfamo K con el detector UV (n=2)

Con el fin de verificar la linealidad del modelo de calibración escogido, se empleó un análisis de varianza (ANOVA), herramienta estadística que estima la varianza de la falta de ajuste al modelo lineal, así como la varianza residual, causada por la incertidumbre asociada a la obtención de respuestas. Ambas varianzas, se comparan mediante una prueba F de Fischer-Snedecor.

De acuerdo con la hipótesis nula, las varianzas son homogéneas, con lo que el modelo lineal sería adecuado y, por tanto, no hay falta de ajuste. Por el contrario, la hipótesis alternativa establece que las varianzas no son comparables, por lo que el modelo lineal no sería adecuado y habría falta de ajuste.

La prueba se hace por comparación entre el estadístico F, calculado como el cociente de las varianzas, y el F crítico para un nivel de significación $\alpha = 0,05$ y los correspondientes grados de libertad. Si $F_{\text{experimental}} < F_{\text{crítico}}$, se acepta la hipótesis nula. Por el contrario, si $F_{\text{experimental}} > F_{\text{crítico}}$, se rechaza la hipótesis nula y ha de aceptarse la hipótesis alternativa en su lugar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 7, 8 y 9 se recogen los resultados obtenidos para el ANOVA.

Tabla 7: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de sacarina con el detector UV ($p=0,05$; $n=2$)

Fuente	g.d.l	SS	MS	F experimental	F crítico
Regresión	1	366723690	366723690	6494,28	-
Residual	14	790561	56468	-	-
Falta de ajuste	6	426683	71113	1,56	3,58
Puro error	8	363878	45484	-	-
Total	15	367514252	-	-	-

Tabla 8: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado de sacarina con el detector FL ($p=0,05$; $n=2$)

Fuente	g.d.l	SS	MS	F experimental	F crítico
Regresión	1	131216	131215	10391,91	-
Residual	14	176,77	12,63	-	-
Falta de ajuste	6	97,56	16,26	1,64	3,58
Puro error	8	79,21	9,90	-	-
Total	15	131393,77	-	-	-

Tabla 9: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado del acesulfamo K con el detector UV ($p=0,05$; $n=2$)

Fuente	g.d.l	SS	MS	F experimental	F crítico
Regresión	1	50903472	50903472	4948,21	-
Residual	14	144021	10287	-	-
Falta de ajuste	6	80249	13375	1,68	3,58
Puro error	8	63772	7971	-	-
Total	15	51047493	-	-	-

Como se puede observar, en los tres casos el F experimental de la falta de ajuste es menor que el F crítico, por lo que se acepta la hipótesis nula; hay homogeneidad de las varianzas, con lo que se acepta como válido el modelo lineal propuesto con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenido el calibrado, se miden las distintas muestras por repetido (n=5). Por comparación con el calibrado obtenido, y teniendo en cuenta la dilución hecha, se obtiene el contenido en sacarina y acesulfamo K en cada una de las muestras.

En las Tablas 10, 11 y 12 se muestra la concentración de sacarina y acesulfamo K presente en cada una de las muestras determinado por este método, después de tener en cuenta la dilución efectuada.

Tabla 10: Concentración de sacarina en las muestras a partir del detector UV

Muestra	Valor mínimo / mg/L	Valor máximo / mg/L	Media / mg/L	% RSD
Muestra 1	84,9	91,5	87,8	2,9
Muestra 2	78,3	82,9	81,4	2,2
Muestra 3	-	-	-	-
Muestra 4	74,8	77,9	76,4	1,4

Tabla 11: Concentración de sacarina en las muestras a partir del detector FL

Muestra	Valor mínimo / mg/L	Valor máximo / mg/L	Media / mg/L	% RSD
Muestra 1	81,1	87,9	83,5	3,3
Muestra 2	75,9	80,1	78,0	2,1
Muestra 3	-	-	-	-
Muestra 4	70,6	75,6	73,0	2,6

Tabla 12: Concentración de acesulfamo K en las muestras a partir del detector UV

Muestra	Valor mínimo / mg/L	Valor máximo / mg/L	Media / mg/L	% RSD
Muestra 1	-	-	-	-
Muestra 2	7,2	7,5	7,3	1,3
Muestra 3	182,6	199,9	191,4	3,2
Muestra 4	-	-	-	-

En la Figura 26 se muestra el cromatograma obtenido de la Muestra 2 mediante el método isocrático utilizado .

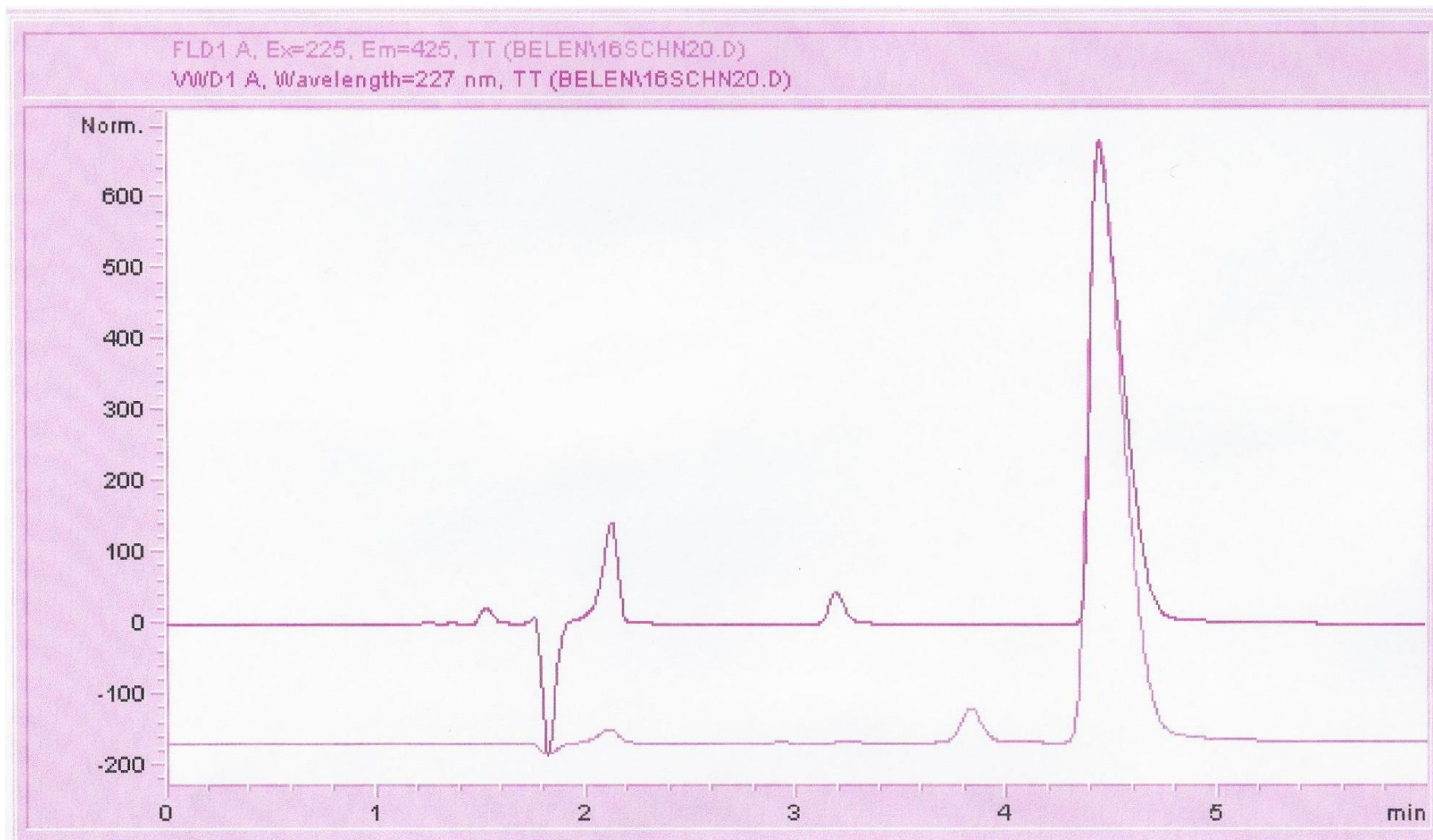


Figura 26: Cromatograma de la Muestra 2 mediante el método isocrático

4.4. Método de adiciones patrón

Como ya se ha mencionado, la sucralosa se estudió, pero su detección no fue posible al no diferenciarse del fondo. Por el contrario, el ácido cítrico, pese a no ser un edulcorante, se estudió debido a su presencia en la mayoría de las gaseosas y al hecho de que absorbe en la misma zona que los compuestos estudiados, como se ve en la Figura 15 anteriormente mostrada.

La determinación de ciclamato y ácido cítrico no ha sido posible mediante HPLC por lo que se ha utilizado un método de calibración de adiciones patrón midiendo en la región ultravioleta del espectro.

Debido a la dificultad de la determinación de ciclamato y ácido cítrico en las muestras por la matriz de las mismas, dicha determinación se ha llevado a cabo mediante el método de adiciones patrón, representando la señal frente a la concentración añadida. La Tabla 13 muestra las concentraciones añadidas de los compuestos para cada dilución. Se llevaron a cabo 6 adiciones patrón, en las cuales la cantidad de gaseosa añadida siempre era la misma, 0,1 mL, y se enrasaba con H₂O.

Tabla 13: Concentraciones de los analitos añadidas

Dilución	Blanco	1	2	3	4	5
Concentración de citrato añadida / mg/L	-	7,76	15,52	31,04	46,57	62,09
Concentración de ciclamato añadida / mg/L	-	7,96	15,92	31,84	47,76	63,68

Una vez obtenidos los resultados, se aplica el procedimiento de adiciones patrón para calcular la concentración de dichas especies en la muestra.

Se midieron las muestras a una longitud de onda de 190 nm con el fin de evitar las longitudes de onda correspondientes a la zona de máxima absorción de la sacarina (203 nm) y el acesulfamo K (227 nm), compuestos que presentan una absorción notable por lo que se podría estar trabajando fuera de la zona de respuesta lineal de la ley de Beer. La realización de diluciones menores para evitar la saturación de la señal no era tampoco aconsejable debido a la relativamente pequeña absorción UV de los analitos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 27 y 28 muestran dos ejemplos de los calibrados de adiciones patrón realizados.

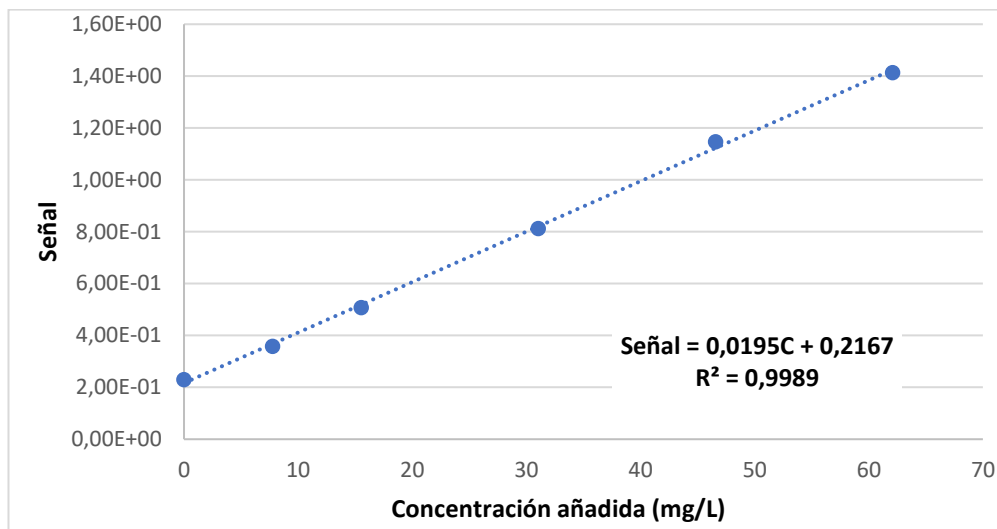


Figura 27: Calibrado de adiciones patrón del ácido cítrico en la Muestra 1

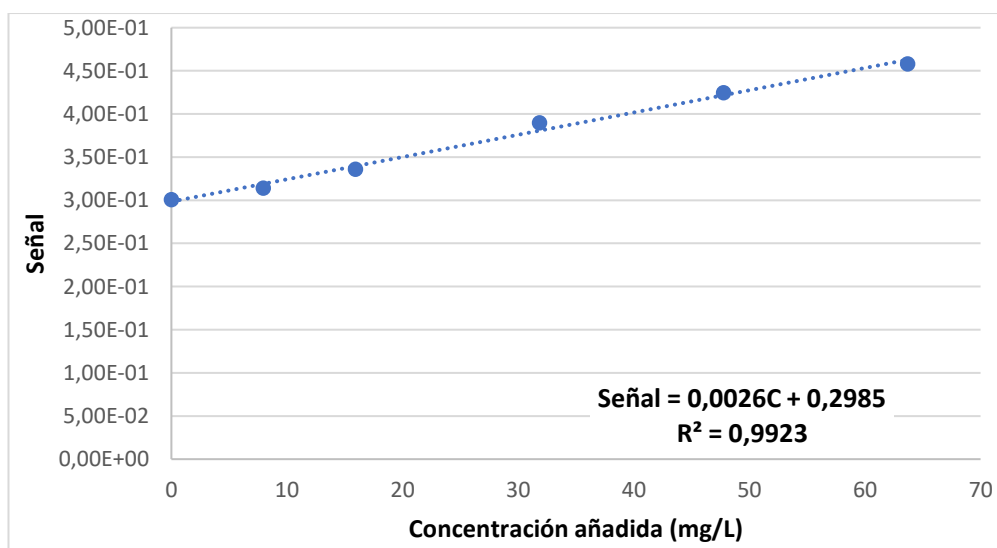


Figura 28: Calibrado de adiciones patrón del ácido ciclámico en la Muestra 2

Una vez hecho el calibrado de adiciones patrón para el ácido ciclámico y ácido cítrico en todas las muestras, se calcula la concentración de los mismos presente en las muestras teniendo en cuenta la dilución hecha. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Experimentalmente, las cantidades determinadas han sido de citrato y ciclamato, calculando a partir de ellas, las concentraciones de ácido cítrico y ácido ciclámico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14: Concentración del ácido cítrico y ácido cicláxico en las muestras

Muestra	Concentración de ácido cítrico (mg/L)	Concentración de ácido cicláxico (mg/L)
Muestra 1	111,4	185,6
Muestra 2	181,2	115,6
Muestra 3	209,1	-
Muestra 4	131,6	193,7

4.5. Fluorescencia

La sacarina es el único compuesto estudiado que presenta fluorescencia, por lo que es el único compuesto que ha podido determinarse en diluciones de las muestras por esta técnica.

En primer lugar, se realizan los espectros de emisión de la sacarina en agua y en HCl, fijándose una $\lambda_{ex} = 300$ nm. La Figura 29 se corresponde con el espectro de emisión de la sacarina en agua con una concentración de 8 mg/L, y la Figura 30 se corresponde con el espectro de emisión de la sacarina en HCl, con una concentración también de 8 mg/L.

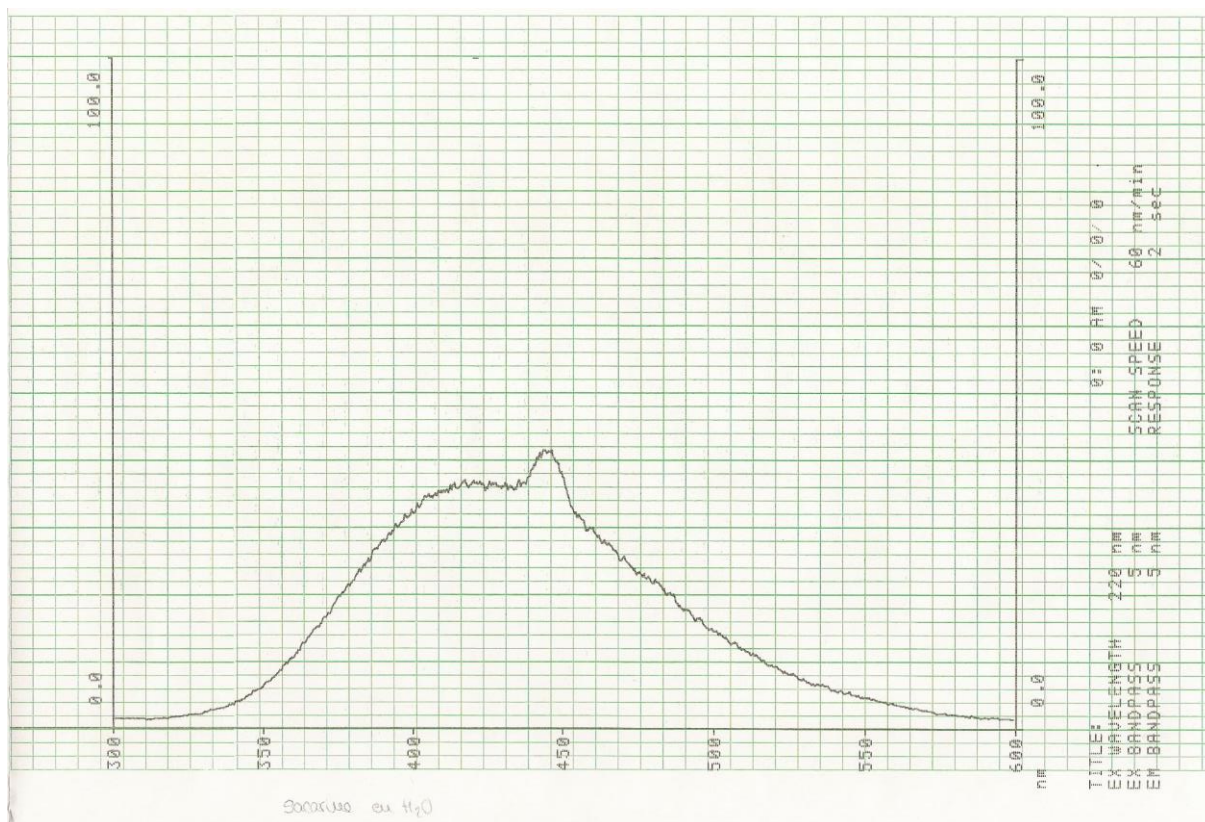


Figura 29: Espectro de emisión de la sacarina en agua

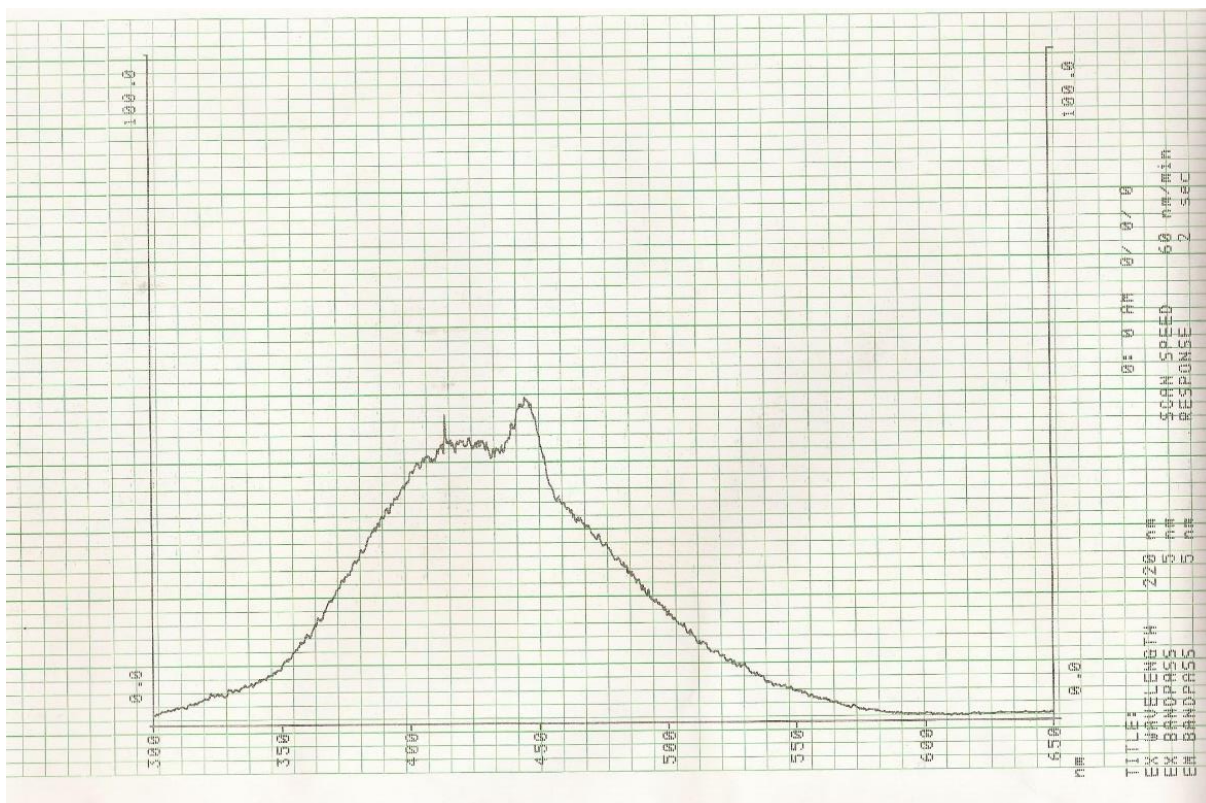


Figura 30: Espectro de emisión de la sacarina en HCl

La Figura 31 muestra la línea de calibrado obtenida para la sacarina a partir de los patrones disueltos en HCl 0,01 M con un intervalo de concentraciones que oscila entre 0,81 y 6,15 mg/L. Se determinaron los límites de detección y cuantificación llegando a un valor de 0,25 mg/L para la detección y 0,71 mg/L para la cuantificación, calculando estos valores como se indicó anteriormente.

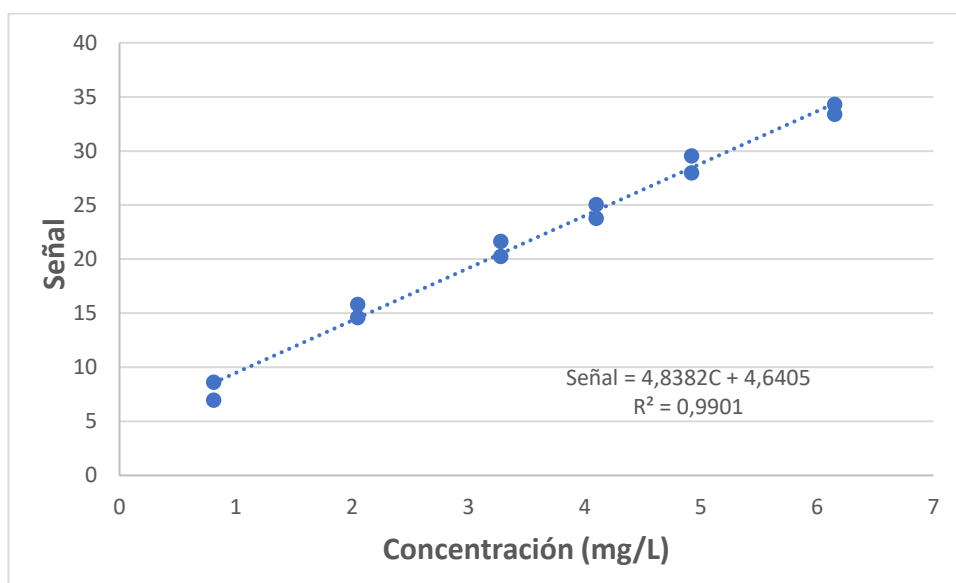


Figura 31: Línea de calibrado para la sacarina (n=2) en fluorescencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtenido el calibrado, se miden las muestras por repetido ($n=5$). Por comparación con el calibrado obtenido, y teniendo en cuenta la dilución hecha, se obtiene el contenido en sacarina en cada una de las muestras.

Con el fin de verificar la linealidad del modelo de calibración escogido, se empleó nuevamente un análisis de varianza (ANOVA). La Tabla 15 muestra los resultados

Tabla 15: Análisis de varianza para comprobar la validez del modelo lineal en el calibrado ($p=0,05$; $n=2$)

Fuente	gdl	SS	MS	F experimental	F crítico
Regresión	1	766,44	766,44	340,85	-
Residual	10	22,49	2,25	-	-
Falta de ajuste	4	10,58	2,64	1,33	4,53
Puro error	6	11,91	1,98	-	-
Total	11	788,92	-	-	-

Como se puede observar, el F experimental de la falta de ajuste es menor que el F crítico, por lo que se acepta la hipótesis nula; hay homogeneidad de las varianzas, con lo que se acepta como válido el modelo lineal propuesto con un nivel de confianza del 95 %.

En la Tabla 16 se muestra la concentración de sacarina presente en cada una de las muestras determinado por este método.

Tabla 16: Concentración de sacarina en las muestras

Muestra	Valor mínimo / mg/L	Valor máximo / mg/L	Media / mg/L	% RSD
Muestra 1	91,0	93,2	91,8	1,0
Muestra 2	81,7	86,1	83,4	2,0
Muestra 3	-	-	-	-
Muestra 4	75,4	79,6	76,6	2,3

4.6. Análisis multicomponente

4.6.1. Determinación conjunta de los analitos

Se calcularon las absorptividades a numerosas longitudes de onda y se midió la absorbancia de la muestra a todas esas longitudes, construyendo las líneas de calibrado que siguen la ley de Beer. A partir de la pendiente del calibrado y considerando que el camino óptico de las cubetas es 1 cm, se calcula la absorptividad.

La Tabla 17 muestra la matriz de absorptividades “K” para cada uno de los compuestos estudiados a numerosas longitudes de onda, así como la absorbancia (vector columna “a”) de la muestra identificada como “Muestra 2” a cada una de las longitudes de onda.

Tabla 17: Matriz de Absorptividades para múltiples longitudes de onda

Longitud de onda / nm	Absorptividades (L mg ⁻¹ cm ⁻¹)				Absorbancia
	Sacarina	Acesulfamo K	Ácido cítrico	Ciclamato	
199	0,15820	0,01449	0,00104	0,00041	0,75022
201	0,17190	0,01605	0,00108	0,00051	0,80941
202	0,17715	0,01708	0,00113	0,00051	0,82333
203	0,17558	0,01829	0,00117	0,00050	0,82364
204	0,17463	0,01965	0,00119	0,00047	0,81452
205	0,16831	0,02111	0,00120	0,00043	0,79500
206	0,15938	0,02269	0,00121	0,00040	0,76698
207	0,14425	0,02437	0,00121	0,00036	0,73626
209	0,12660	0,02794	0,00119	0,00030	0,68463
225	0,05419	0,05373	0,00062	0,00010	0,56441
227	0,05164	0,05421	0,00054	9,63E-05	0,55477
228	0,05049	0,05406	0,00049	9,313E-05	0,54751
229	0,04708	0,05365	0,00045	8,889E-05	0,53042
230	0,04160	0,05296	0,00041	8,445E-05	0,50395
234	0,03007	0,04829	0,00027	7,119E-05	0,42780
236	0,02729	0,04503	0,00022	6,75E-05	0,39504
240	0,00950	0,03755	0,00014	5,534E-05	0,28021
244	0,00702	0,03029	9,9867E-05	5,107E-05	0,22334
250	0,00724	0,02101	6,9303E-05	4,706E-05	0,16313
253	0,00736	0,01695	6,1893E-05	4,624E-05	0,13749

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La resolución matemática del sistema de ecuaciones matriciales puede hacerse de forma “secuencial-manual” mediante el software Excel, o bien de forma más rápida con el software “Statgraphics Centurion XVIII”.

El modelo del análisis multicomponente es $a = K C$, las concentraciones (vector columna C) se calculan como: $C = ({}^T K K)^{-1} {}^T K a$.

La Tabla 18 muestra las concentraciones calculadas para la Muestra 2, después de corregir la dilución 1:4 efectuada.

Tabla 18: Concentraciones de los compuestos estudiados

Compuesto	Concentración / mg/L
Sacarina	39,7 ± 11,6
Acesulfamo K	64,8 ± 6,6
Ácido cítrico	-
Ciclamato	538,8 ± 296,4

A la vista de los resultados obtenidos, se vio que no era posible el análisis multicomponente con todos los compuestos estudiados, ya que los resultados obtenidos no eran consistentes con los obtenidos con los métodos anteriores y, además, los intervalos de confianza calculados son muy amplios. Tras calcular la condición de la matriz de absorptividades K, se obtiene un valor excesivamente grande, de 5620, lo que reafirma que no es aconsejable llevar a cabo el análisis multicomponente de todos los compuestos porque los errores experimentales se pueden amplificar en gran cuantía. La condición de la matriz K, 5620, indica que los errores experimentales se pueden amplificar hasta 5620 veces.

La razón de ello puede ser la falta de selectividad en las medidas de longitud de onda, ya que las longitudes de onda no son específicas para cada compuesto, unido a grandes diferencias de sensibilidad (absortividad) entre ellos, así como las posibles interferencias debido a los aromas presentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.6.2. Determinación de sacarina y acesulfamo K

Posteriormente, se repitió el análisis multicomponente solo para el acesulfamo K y la sacarina trabajando a longitudes de onda superiores, donde solo absorben estos dos edulcorantes y se simplifica, al menos en principio, la influencia de la matriz. La matriz de absorptividades K se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19: Matriz de absorptividades para la sacarina y el acesulfamo K

Longitud de onda / nm	Absorptividades ($L\ mg^{-1}\ cm^{-1}$)		Absorbancia Muestra 1	Absorbancia Muestra 2	Absorbancia Muestra 3	Absorbancia Muestra 4
	Sacarina	Acesulfamo K				
250	0,00724	0,02101	0,15133	0,24216	1,00724	0,16326
255	0,00743	0,01446	0,15541	0,22966	0,68093	0,16676
260	0,00749	0,00906	0,15939	0,22069	0,41146	0,17079
265	0,00751	0,00504	0,16184	0,21430	0,21213	0,17314
270	0,00745	0,00248	0,16080	0,20804	0,08501	0,17128

Se llevó a cabo el estudio con esta matriz para todas las muestras analizadas. Los resultados se muestran en la Tabla 20. El procedimiento de cálculo permite calcular los intervalos de confianza ($p = 0,05$) al medirse la absorbancia a múltiples longitudes de onda.

Tabla 20: Concentraciones de sacarina y acesulfamo K en las muestras

Muestra	Concentración de sacarina (mg/L)	Concentración de acesulfamo K (mg/L)
Muestra 1	$86,7 \pm 1,3$	-
Muestra 2	$108,2 \pm 2,6$	$8,5 \pm 1,6$
Muestra 3	-	$198,86 \pm 0,3$
Muestra 4	$92,3 \pm 1,6$	-

A la vista de los resultados obtenidos, se puede ver que se obtienen resultados más coherentes de acuerdo a las concentraciones determinadas mediante los otros procedimientos. Como se ha mencionado, esto puede ser debido a que las longitudes de onda escogidas en esta matriz son mayores que en la matriz anterior, y son más selectivas, ya que en esa zona solo absorben mayoritariamente el acesulfamo K y la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sacarina. Además, tras calcular la condición de la matriz de absorptividades, se obtiene un valor, de 3,87, próximo a la unidad (valor ideal a conseguir) lo que confirma que el método está bien condicionado.

4.7. Comparación de los resultados de sacarina y acesulfamo K

En las Tablas 21 y 22 se comparan los resultados de las concentraciones de sacarina y acesulfamo K obtenidas tras el análisis de las muestras mediante los distintos métodos empleados.

Tabla 21: Concentración de sacarina en las muestras obtenidas por los distintos métodos utilizados

Muestra	HPLC-UV	HPLC-FL	Fluorescencia	Multicomponente
Muestra 1	87,8	83,5	91,8	86,7
Muestra 2	81,4	78	83,4	108,2
Muestra 3	-	-	-	-
Muestra 4	76,4	73	76,6	92,3

Tabla 22: Concentración de acesulfamo K en las muestras obtenidas por los distintos métodos utilizados

Muestra	HPLC-UV	Multicomponente
Muestra 1	-	-
Muestra 2	7,3	8,5
Muestra 3	191,4	198,8
Muestra 4	-	-

A la vista de los resultados obtenidos, se puede observar que en el caso de la sacarina se obtienen resultados más o menos similares mediante HPLC con detección ultravioleta y mediante fluorescencia, algo superiores en el caso del análisis multicomponente, y algo inferiores en el caso de HPLC con detección fluorescente. El acesulfamo solo se determinó por dos métodos, pero también se observan resultados mayores en el caso del análisis multicomponente

Solo se ha hecho una determinación de acesulfamo K y sacarina mediante análisis multicomponente, pero los resultados obtenidos sugieren que las concentraciones

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

medidas son generalmente algo mayores, lo que podría indicar algún tipo de error sistemático cuyo origen no se puede conocer con la experimentación efectuada.

Como la concentración de sacarina se ha determinado como una media de 5 experimentos mediante 3 técnicas diferentes, se han comparado los resultados obtenidos mediante estas técnicas para las 3 muestras de gaseosa que contenían sacarina. Para ello se ha efectuado un ANOVA de 1 factor.

En las Tabla 23, 24 y 25 se muestran los ANOVA efectuados. Para las 3 muestras resulta que las concentraciones medias determinadas en una misma muestra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) dependiendo de la técnica de análisis, ya que el valor de F calculado experimentalmente es mayor que el F crítico.

Tabla 23: ANOVA de un factor para la Muestra 1

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	172,28	2	86,14	16,74	0,00034	3,89
Dentro de los grupos	61,77	12	5,15			
Total	234,05	14				

Tabla 24: ANOVA de un factor para la Muestra 2

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	74,35	2	37,18	13,04	0,00098	3,89
Dentro de los grupos	34,20	12	2,85			
Total	108,56	14				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 25: ANOVA de un factor para la Muestra 4

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	39,94	2	19,97	7,47	0,0078	3,89
Dentro de los grupos	32,08	12	2,67			
Total	72,02	14				

Si se observa la Tabla 21 comparativa de medias, se deduce que la concentración determinada mediante HPLC con detección de fluorescencia proporciona valores menores con respecto a las otras dos técnicas, lo que indica que se comete un error sistemático en la determinación, bien mediante esta técnica o bien mediante las otras dos que proporcionan resultados aparentemente similares entre sí.

5. Conclusiones

El ciclamato y el ácido cítrico no son retenidos mediante el empleo de una columna cromatográfica de ODS (150 x 4,6 mm, 5 μ m). La absorptividad de la sucralosa en el espectro UV cercano es muy pequeña, por lo que no ha podido ser determinada.

La sacarina y el acesulfamo K pueden ser determinados en muestras de bebidas carbonatadas mediante HPLC con una detección UV. Adicionalmente, la sacarina puede ser determinada directamente en muestras diluidas mediante fluorescencia molecular.

El análisis multicomponente mediante espectrofotometría ultravioleta-visible de los edulcorantes ciclamato, sacarina y acesulfamo K, y ácido cítrico, no es factible como consecuencia, principalmente, de la falta de selectividad en las medidas de absorbancia en la región del espectro en que absorben.

El análisis multicomponente solo es aplicable a la determinación de sacarina y acesulfamo K en bebidas gaseosas, ya que estos compuestos son los únicos que presentan absorbancia a longitudes de onda superiores que permiten una mayor selectividad.

La repetitividad expresada como desviación típica relativa en la determinación de sacarina y acesulfamo K mediante la técnica de HPLC es igual o inferior al 3,3% (n=5) mientras que la repetitividad en el análisis de sacarina mediante fluorimetría directa es del 3,2%.

Las concentraciones de ácido cítrico y ácido cicláamico varían entre 111 y 209 mg/L, y 116-194 mg/L, respectivamente, en las muestras analizadas de acuerdo con una calibración adición-patrón obtenida por la medida de absorbancia a 190 nm.

La concentración de acesulfamo K en las dos muestras que contienen este edulcorante es muy diferente, del orden de 8 y 195 mg/L. La concentración de sacarina en las muestras que lo contienen es más uniforme, del orden de 75-90 mg/L.

La concentración de sacarina determinada en 3 muestras mediante HPLC con detección de fluorescencia es significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a las concentraciones medidas mediante HPLC con detección UV y fluorimetría directa.

6. Bibliografía

- Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2004). Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis. *Analytica Chimica Acta*, 521(2), 149-155. doi:10.1016/j.aca.2004.05.077
- Bidlingmeyer, B. A., & Schmitz, S. (1991). The Analysis of Artificial Sweeteners and Additives in Beverages by HPLC. *Journal of Chemical Education*, 68(8), A195-A200.
- Bruno, S. N., Cardoso, C. R., Maciel, M. M., Vokac, L., & da Silva Junior, A. I. (2014). Selective identification and quantification of saccharin by liquid chromatography and fluorescence detection. *Food Chem*, 159, 309-315. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.001
- REGLAMENTO (UE) Nº 1129/2011 DE LA COMISIÓN de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión, 1129/2011 C.F.R. (2011).
- Ellis, J. W. (1995). Overview of Sweeteners. *Journal of Chemical Education*, 72, 671-675. doi:10.1021/ed072p671,
- Fenk, C. J., Kaufman, N., & Donald G. Gerbig, J. (2007). A New Colorimetric Assay of Tabletop Sweeteners Using a Modified Biuret Reagent. *Journal of Chemical Education*, 84, 1676-1678.
- Ferrer, I., & Thurman, E. M. (2010). Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1217(25), 4127-4134. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.020
- Frazier, R. A., Inns, E. L., Dossi, N., Ames, J. M., & Nursten, H. E. (2000). Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. *Journal of Chromatography A*, 876, 213-220.
- Gan, Z., Sun, H., Wang, R., & Feng, B. (2013). A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid

- chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1274, 87-96. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.081
- Gao, H., Yang, M., Wang, M., Zhao, Y., Cao, Y., & Chu, X. (2013). Determination of 30 synthetic food additives in soft drinks by HPLC/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*, 96(1), 110-115. doi:10.5740/jaoacint.12-046
- George, V., Arora, S., Wadhwa, B. K., & Singh, A. K. (2010). Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates. *J Food Sci Technol*, 47(4), 408-413. doi:10.1007/s13197-010-0067-4
- Gui, J.-Y., Sun, W., Zhang, C.-L., Zhang, Y.-T., Zhang, L., & Liu, F. (2016). An Innovative Approach to Sensitive Artificial Sweeteners Analysis by Ion Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(3), 361-366. doi:10.1016/s1872-2040(16)60914-3
- Herrmannova, M., Krivankova, L., Bartos, M., & Vytras, K. (2006). Direct simultaneous determination of eight sweeteners in foods by capillary isotachopheresis. *J Sep Sci*, 29(8), 1132-1137. doi:10.1002/jssc.200500441
- Li, X., Li, S., Li, H., Wang, J., Luo, Q., & Yin, X. (2021). Quantification of artificial sweeteners in alcoholic drinks using direct analysis in real-time QTRAP mass spectrometry. *Food Chem*, 342, 128331. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128331
- Lim, H.-S., Park, S.-K., Kwak, I.-S., Kim, H.-I., Sung, J.-H., Jang, S.-J., . . . Kim, S.-H. (2013). HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. *Food Science and Biotechnology*, 22(S1), 233-240. doi:10.1007/s10068-013-0072-2
- Lino, C. M., & Pena, A. (2010). Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chemistry*, 121(2), 503-508. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.073
- Sastry, C. S. P., Srinivas, K. R., Prasad, K. M. M. K., & Krishnamacharyulu, A. G. (1995). Rapid, Routine Method for the Analysis of the Non-nutritive Sweeteners in Foodstuffs. *Analyst*, 120, 1793-1797.
- Scheurer, M., Brauch, H. J., & Lange, F. T. (2009). Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal Bioanal Chem*, 394(6), 1585-1594. doi:10.1007/s00216-009-2881-y

BIBLIOGRAFÍA

- Schuster, R., & Gratzfeld-Hüsgen, A. (2009). CZE analysis of artificial sweeteners and preservatives in drinks. *Agilent Technologies*, 5990-3402EN, 8.
- Shah, R., & Jager, L. S. d. (2017). Recent Analytical Methods for the Analysis of Sweeteners in Food: A Regulatory Perspective. *Food and Drug Administration Papers*, 5, 13-32.
- Sik, B. (2012). Development and Validation of a Green High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Some Artificial Sweeteners and Caffeine in Soft Drinks. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1443-1452. doi:10.1007/s12161-012-9385-7
- Tighrine, A., Amir, Y., Alfaro, P., Mamou, M., & Nerin, C. (2019). Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid-liquid extraction method prior to ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chem*, 277, 586-594. doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.107
- UniversidaddeValladolid. (2020-2021). Apuntes de la asignatura Herramientas Quimométricas para el Análisis y Tratamiento de Datos. In.
- Üstün Özgür, M., & Kasapoğlu, M. (2019). Development and Validation of a Simple Ultra Fast Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Aspartame, Acesulfame-K, Caffeine and Sodium Benzoate in Dietic Soft Drinks. *Journal of Analytical Chemistry*, 74(6), 555-564. doi:10.1134/s1061934819060133
- Weinert, P. L., Pezza, H. R., Oliveira, J. E. D., & Pezza, L. (2004). A Simplified Spectrophotometric Method for Routine Analysis of Saccharin in Commercial Noncaloric Sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7788–7792. doi:10.1021/jf0402781