



***UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR***

**TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA**

***“MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES  
POTENCIALMENTE PELIGROSAS EN ALIMENTOS. CONTRIBUCIÓN AL  
CONTROL DE CALIDAD”***

***Lic. Natalia Elizabeth Llamas***

***BAHIA BLANCA***

***ARGENTINA***

***2009***

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 18 de mayo de 2004 y el 19 de diciembre de 2008, bajo la dirección de Dra. Beatriz Susana Fernández Band, Profesora Titular de Química Analítica y la dirección asistente de la Dra. María Susana Di Nezio, Asistente de Docencia de Química Analítica.

Natalia Elizabeth Llamas

Licenciada en Química



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación  
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ....., mereciendo la  
calificación de .....

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Fernández Band por su colaboración a mi formación científica y el estímulo constante, que hizo posible concretar esta Tesis.

A la Dra. María Susana Di Nezio, mi compañera de aventuras, por ofrecerme su experiencia, dedicación y estímulo constantes, por su paciencia y confianza brindadas. Por permitirme crecer como profesional y desarrollar este trabajo de Tesis.

Al CONICET, por las becas otorgadas.

A María Eugenia, Marcelo, Mónica A. y Adriana por sus palabras de apoyo.

A Mariano por la confianza y el tiempo compartido en el último trabajo de esta Tesis.

A Cali, Silvana, Ale y Gloria por el tiempo compartido.

Gracias a Caro, Marcos, Sonia y Vivi, por brindarme su amistad, por compartir cada uno de los momentos vividos a lo largo de este camino.

A mi grupo de oración Servidoras Ignacianas y a Guillermo Ortiz, S.J., por las palabras de apoyo y la fuerza brindada durante este período.

A Cari, por estar siempre, por tu ayuda y palabras de aliento.

A mi sobrino Hernán, mi hermana, Gaby y Rubén, mi cuñado, por el apoyo brindado en esta última etapa de la Tesis.

A Gustavo, mi esposo, por estar en todo momento, por el amor incondicional, por la fuerza, la confianza y la paciencia. Gracias, mi amor.

A mi abuela María por estar siempre conmigo, por su cálida y constante compañía.

A mis padres, por haberme dado la posibilidad de estudiar. Gracias por la compañía y el amor diario, por darme la fuerza para levantarme y seguir adelante. Gracias, gracias, gracias.

## RESUMEN

Los aditivos alimentarios presentan un papel importante en la industria moderna y generalmente, son empleados para preservar la calidad, características y seguridad de los alimentos. Sin embargo, la utilización inadecuada de los mismos o excediendo los límites establecidos implican un riesgo para la salud del consumidor. Debido a esto, en los últimos años, se han desarrollado un gran número de métodos analíticos para su cuantificación. Algunos de estos métodos son laboriosos y consumen tiempo de análisis, mientras que otros necesitan instrumentos de elevado costo o tienen limitaciones de sensibilidad y selectividad.

En este trabajo de Tesis Doctoral se propone implementar nuevos métodos analíticos para la determinación de dichas especies en alimentos, contribuyendo así al control de calidad de los mismos.

En una primera etapa, se desarrolló un sistema automatizado utilizando la metodología de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección turbidimétrica, para la determinación de ciclamato. La reproducibilidad, velocidad de muestreo y sensibilidad obtenidas son aceptables. Su aplicación fue probada con éxito en endulzantes de mesa, gaseosas y jugos de fruta, ambos dietéticos, sin tratamiento previo de las muestras, lo que significa una ventaja adicional. El método fue validado frente al método oficial propuesto por la AOAC.

Como segundo trabajo de Tesis, se desarrolló un método analítico para la determinación de sacarina y acesulfame-K, utilizando espectros de absorción molecular y calibración multivariada (PLS-1) como herramienta quimiométrica. Este método se aplicó a muestras endulzantes comerciales (líquidos y sólidos) y jugos de fruta en polvo que contenían aspartamo en su composición. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios. El método fue validado a través del uso de muestras enriquecidas

obteniéndose muy buenos porcentajes de recuperación y es una buena alternativa, para la determinación de sacarina y acesulfame-K ya que es simple, rápido y no se necesita realizar un tratamiento previo de las muestras.

Posteriormente, se propuso la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales en muestras de jugos de fruta comerciales y naturales de naranja y pomelo. Los azúcares son moléculas no absorbentes mientras que el ácido ascórbico exhibe bandas de absorción en la zona UV del espectro electromagnético. Además, estas especies presentan un comportamiento diferente cuando se las somete a radiación UV. Para llevar a cabo la determinación, se diseñó un sistema FIA donde se detecta, en una primera inyección de la muestra, el ácido ascórbico. Luego, se realiza una segunda inyección de muestra la cual es sometida a radiación UV lo cual provoca la desaparición de la señal del ácido ascórbico y la aparición de una señal debida a la oxidación de los azúcares. El método fue validado a través del uso de muestras enriquecidas obteniéndose muy buenos porcentajes de recuperación.

Finalmente, se desarrolló un método analítico para la determinación de amarillo ocaso, amaranto y tartrazina empleando espectros de absorción molecular y Resolución Multivariada de Curvas optimizado con Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS), como herramienta quimiométrica. El método se aplicó a muestras de gaseosas, aguas saborizadas y bebidas hidratantes y fue validado a través de un ensayo de recuperación y mediante materiales de referencia, obteniéndose resultados satisfactorios. El método desarrollado es simple, rápido, de bajo costo y es una buena alternativa para la cuantificación de colorantes en alimentos.

## ABSTRACT

Additives play an important role in the modern industry. They are used to preserve the quality, characteristics and safety of foods. Nevertheless, an inadequate use of them implies a risk for the health of the consumer. In the last years, a great number of analytical methods have been developed for quantitative determination of dyes. Some of them are laborious and time consuming, whereas others need a very expensive instrumentation or have certain limitations on sensitivity and selectivity. Thus, new analytical methods for additives determination were implemented in this Doctoral Thesis.

A flow injection turbidimetric method for determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners, without pre-treatment, was proposed. It was based on the oxidation of the sulphamic group of cyclamate, to sulphate by adding sodium nitrite. Then, a precipitate of sulphate was obtained when the barium chloride was added, in presence of poly (vinyl alcohol) (PVA) and perchloric acid medium, at 30°C. The analytical signal was measured at 420 nm. A linear range between 0.015 and 0.120 % (w/v) was obtained and the calibration curve was  $S = (7.792 \pm 0.179) C - (0.114 \pm 0.012)$ ,  $R^2 = 0.999$ . A reproducibility of 5.9 % was obtained from nine calibration graphs that were carried out during different days and in different conditions (standard solution, reagents solution, etc.). The detection and quantification limits were 0.006 and 0.02 % (w/v), respectively, the sample throughput 45 h<sup>-1</sup> (by considering the wash cycle and the time consuming to eliminate the clean solution from the system). The obtained results agree with the obtained by the standard method.

A simple and rapid analytical procedure for determination of saccharin (SAC) and acesulfame-K (AC-K) based on UV-Vis measurements and partial least squares

(PLS) was proposed. Thus, an experimental design at levels 2 and 15 mg L<sup>-1</sup> of SAC and 2 and 20 mg L<sup>-1</sup> of AC-K were applied. Owing to the real samples usually contain SAC and AC-K combined with aspartame (ASP), this interference was also included in the model. The procedure for simultaneous determination of SAC and AC-K in sweeteners and fruit juice powders, without any separation step to remove ASP, was successfully applied. The method was validated by using spiked samples, and the obtained recoveries were satisfactory.

A FIA method for determination of ascorbic acid and total sugars was developed. This method was based on the different behaviors of the analytes when they were submitted to UV radiation. The flow-injection system includes a simple ultraviolet photoreactor for the on-line photodegradation of the analytes. The first injection of the sample was for ascorbic acid determination at 300 nm. Then a second injection of the sample was exposed to the UV light for five minutes in order to determine total sugars at 268 nm and the absorption band of ascorbic acid disappeared for action of the radiation. The proposed method was used for the determination of ascorbic acid and total sugars in commercial and natural fruit juices samples. The method was validated by using spiked samples with recoveries in the range 96.4 and 108.3 % for ascorbic acid and 91.0 and 113.2 % for total sugars.

Finally, an analytical method for Sunset Yellow, Amaranth and Tartrazine determination, based on UV-Vis measurements and Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS), was proposed. The method was applied to soft drinks, flavored waters and energy drinks. The method was validated by preparing reference samples in the laboratory and its concentration was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The developed method is simple, fast and inexpensive; it is a good alternative for determining dyes in foods.



# *Índices*



## ÍNDICE

## Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1. ADITIVOS ALIMENTARIOS	-1-
1.1.1. <i>Regulación legal de los aditivos</i>	-2-
1.1.2. <i>Seguridad de los aditivos</i>	-4-
1.1.3. <i>Funciones y clasificación de los aditivos alimentarios</i>	-6-
<i>Edulcorantes</i>	-10-
<i>Antioxidantes</i>	-11-
<i>Colorantes</i>	-12-
1.2. AUTOMATIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	-14-
1.2.1. <i>Análisis por Inyección en Flujo (FIA)</i>	-17-
1.3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	-22-
1.3.1. <i>Calibración Multivariada</i>	-22-
BIBLIOGRAFÍA	-24-

## Capítulo 2: DETERMINACIÓN DE CICLAMATO EMPLEANDO ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA) Y DETECCIÓN TURBIDIMÉTRICA

2.1. INTRODUCCIÓN	-26-
2.2. OBJETIVO	-30-
2.3. FUNDAMENTO	-30-
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	-31-
2.4.1. <i>Reactivos y soluciones</i>	-31-
2.4.2. <i>Instrumentación</i>	-32-
2.4.3. <i>Procedimiento</i>	-32-
2.4.4. <i>Muestras reales</i>	-33-

<b>2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>-34-</b>
<b>2.5.1. Orden de agregado de reactivos</b>	<b>-34-</b>
<b>2.5.2. Optimización de Variables Químicas y FIA</b>	<b>-34-</b>
<b>2.5.2.1. Optimización de Variables Químicas</b>	<b>-35-</b>
I- Concentración de $\text{NaNO}_2$	<b>-35-</b>
II- Solución de $\text{BaCl}_2\text{-PVA-HClO}_4$	<b>-35-</b>
III- Solución de lavado de $\text{EDTA-NaOH}$	<b>-37-</b>
<b>2.5.2.2. Optimización de Variables FIA</b>	<b>-38-</b>
I- Longitud del reactor $R_1$	<b>-38-</b>
II- Longitud del reactor $R_2$	<b>-38-</b>
III- Volumen de muestra	<b>-39-</b>
IV- Caudal de la solución portadora	<b>-39-</b>
V- Caudal de la solución de $\text{NaNO}_2$	<b>-40-</b>
VI- Caudal de la solución de $\text{BaCl}_2\text{-PVA-HClO}_4$	<b>-40-</b>
VII- Caudal de la solución $\text{EDTA-NaOH}$	<b>-40-</b>
<b>2.5.3. Optimización de la temperatura de formación del precipitado</b>	<b>-41-</b>
<b>2.5.4. Interferencias de otros aditivos</b>	<b>-42-</b>
<b>2.5.5. Parámetros analíticos</b>	<b>-43-</b>
<b>2.5.6. Análisis de muestras reales</b>	<b>-44-</b>
<b>2.5.7. Validación del método propuesto</b>	<b>-45-</b>
<b>2.6. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	<b>-46-</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>-47-</b>

---

**Capítulo 3: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE SACARINA Y ACESULFAME-K****UTILIZANDO ESPECTROMETRÍA UV Y PLS-1**

<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>-49-</b>
<b>3.2. OBJETIVO</b>	<b>-53-</b>
<b>3.3. FUNDAMENTO</b>	<b>-53-</b>
3.3.1. <i>Regresión por Cuadrados Mínimos Parciales</i>	<i>-53-</i>
3.3.2. <i>Diseño de Experimentos</i>	<i>-56-</i>
<b>3.4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>-58-</b>
3.4.1. <i>Reactivos y soluciones</i>	<i>-58-</i>
3.4.2. <i>Instrumentación</i>	<i>-59-</i>
3.4.3. <i>Conjunto de calibración y validación</i>	<i>-59-</i>
3.4.4. <i>Figuras de mérito</i>	<i>-61-</i>
3.4.5. <i>Muestras reales</i>	<i>-62-</i>
<b>3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>-63-</b>
3.5.1. <i>Espectros de absorción de SAC, AC-K y ASP</i>	<i>-63-</i>
3.5.2. <i>Modelos PLS para calibración y validación</i>	<i>-67-</i>
3.5.3. <i>Parámetros estadísticos</i>	<i>-68-</i>
3.5.4. <i>Análisis de muestras reales</i>	<i>-69-</i>
3.5.5. <i>Estudio de recuperación</i>	<i>-73-</i>
3.5.6. <i>Estudio de interferentes</i>	<i>-75-</i>
<b>3.6. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	<b>-76-</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>-77-</b>



---

**Capítulo 4: DETERMINACIÓN AUTOMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y AZÚCARES****TOTALES UTILIZANDO FOTODEGRADACIÓN EN LÍNEA**

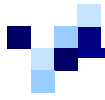
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>-79-</b>
<b>4.2. OBJETIVO</b>	<b>-85-</b>
<b>4.3. FUNDAMENTO</b>	<b>-85-</b>
<b>4.4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>-88-</b>
4.4.1. <i>Reactivos y soluciones</i>	<b>-88-</b>
4.4.2. <i>Instrumentación</i>	<b>-89-</b>
4.4.3. <i>Procedimiento</i>	<b>-90-</b>
4.4.4. <i>Muestras reales</i>	<b>-91-</b>
<b>4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>-92-</b>
4.5.1. <i>Comportamiento del ácido ascórbico y los azúcares totales frente a la radiación UV</i>	<b>-92-</b>
I- <i>Efecto del pH</i>	<b>-93-</b>
II- <i>Influencia del tiempo de irradiación</i>	<b>-95-</b>
4.5.2. <i>Influencia de Variables FIA</i>	<b>-97-</b>
4.5.3. <i>Parámetros analíticos</i>	<b>-98-</b>
4.5.4. <i>Análisis de muestras reales</i>	<b>-99-</b>
4.5.5. <i>Validación del método propuesto</i>	<b>-100-</b>
<b>4.6. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	<b>-102-</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>-103-</b>

**Capítulo 5: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMARANTO, AMARILLO OCASO Y TARTRAZINA EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA UV-V Y MCR-ALS**

<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>-105-</b>
<b>5.2. OBJETIVO</b>	<b>-110-</b>



<b>5.3. FUNDAMENTO</b>	<b>-110-</b>
<b>5.3.1. Resolución Multivariada de Curvas. Optimización mediante</b>	
<b>Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS)</b>	<b>-110-</b>
<b>5.4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>-117-</b>
<b>5.4.1. Reactivos y soluciones</b>	<b>-117-</b>
<b>5.4.2. Instrumentación</b>	<b>-117-</b>
<b>5.4.3. Procedimiento</b>	<b>-118-</b>
<b>I- Muestras reales</b>	<b>-118-</b>
<b>II- Patrones puros</b>	<b>-119-</b>
<b>III- Mezclas sintéticas</b>	<b>-119-</b>
<b>5.4.3.1. Aplicación de MCR-ALS</b>	<b>-120-</b>
<b>5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>-121-</b>
<b>5.5.1. Espectros de absorción de AM, AO y TAR</b>	<b>-121-</b>
<b>5.5.2. Análisis de datos</b>	<b>-124-</b>
<b>I- Determinación del número de componentes</b>	<b>-124-</b>
<b>II- Construcción de la estima inicial</b>	<b>-125-</b>
<b>III- Optimización mediante Mínimos Cuadrados Alternados</b>	<b>-126-</b>
<b>IV- Curvas de calibrado</b>	<b>-127-</b>
<b>V- Mezclas sintéticas</b>	<b>-128-</b>
<b>5.5.3. Análisis de muestras reales</b>	<b>-129-</b>
<b>5.5.4. Validación del método propuesto</b>	<b>-131-</b>
<b>5.6. CONCLUSIONES PARCIALES</b>	<b>-137-</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>-138-</b>
<b>Capítulo 6: CONCLUSIÓN</b>	
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>-140-</b>



Apéndice

PRODUCTIVIDAD	-142-
<i>Publicaciones en Revistas Científicas</i>	-142-
<i>Presentaciones en Reuniones Científicas Nacionales</i>	-143-

## ÍNDICE DE FIGURAS

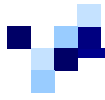
<i>Figura 1.1. Finalidades y objetivos de la Química Analítica</i>	<i>-14-</i>
<i>Figura 1.2. Componentes de un sistema FIA</i>	<i>-19-</i>
<i>Figura 1.3. Parámetros de una señal FIA</i>	<i>-20-</i>
<i>Figura 2.1. Obtención de ciclamato de sodio a partir de la sulfonación de ciclohexilamina</i>	<i>-26-</i>
<i>Figura 2.2. Formación de ciclohexilamina a partir de la hidrólisis del ciclamato</i>	<i>-27-</i>
<i>Figura 2.3. Sistema FIA para la determinación de ciclamato</i>	<i>-33-</i>
<i>Figura 2.4. Optimización de la concentración de <math>\text{NaNO}_2</math></i>	<i>-35-</i>
<i>Figura 2.5. Optimización de la concentración de PVA</i>	<i>-36-</i>
<i>Figura 2.6. Optimización de la concentración del <math>\text{BaCl}_2</math></i>	<i>-37-</i>
<i>Figura 2.7. Optimización de la longitud del reactor <math>R_2</math></i>	<i>-39-</i>
<i>Figura 2.8. Optimización del caudal del agente oxidante</i>	<i>-40-</i>
<i>Figura 2.9. Optimización de la temperatura óptima de trabajo</i>	<i>-41-</i>
<i>Figura 2.10. Curva de calibrado de ciclamato de sodio a 420 nm</i>	<i>-44-</i>
<i>Figura 3.1. Estructura química de: a. sacarina y b. acesulfame-K</i>	<i>-51-</i>
<i>Figura 3.2. Espectros de absorción para sacarina, acesulfame-K y aspartamo a pH ácido, neutro y alcalino</i>	<i>-63-</i>
<i>Figura 3.3. Espectros de absorción para sacarina, acesulfame-K y aspartamo a pH ácido, neutro y alcalino</i>	<i>-65-</i>
<i>Figura 3.4. Espectros de absorción de SAC, AC-K y ASP a pH 1,3</i>	<i>-67-</i>
<i>Figura 3.5. Espectros de absorción de las muestras utilizadas</i>	<i>-70-</i>
<i>Figura 4.1. Estructuras químicas: a. fructosa, b. glucosa, c. sacarosa</i>	<i>-81-</i>
<i>Figura 4.2. Estructura química del ácido ascórbico</i>	<i>-82-</i>
<i>Figura 4.3. Foto del fotorreactor</i>	<i>-89-</i>

<b>Figura 4.4.</b> Sistema FIA para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales	<b>-90-</b>
<b>Figura 4.5.</b> Espectros de absorción de la fructosa a diferentes pH luego de 5 min de exposición a la radiación UV	<b>-94-</b>
<b>Figura 4.6.</b> Espectro de absorción del ácido ascórbico a diferentes pH	<b>-94-</b>
<b>Figura 4.7.</b> Espectros de absorción del ácido ascórbico y la fructosa antes del paso de fotodegradación	<b>-96-</b>
<b>Figura 4.8.</b> Efecto del tiempo de irradiación en el ácido ascórbico y la fructosa	<b>-96-</b>
<b>Figura 4.9.</b> Espectros de absorción del ácido ascórbico y fructosa luego de 5 min de degradación con luz UV	<b>-97-</b>
<b>Figura 4.10.</b> Curvas de calibrado: <b>a.</b> ácido ascórbico y <b>b.</b> azúcares totales	<b>-99-</b>
<b>Figura 5.1.</b> Estructura química de: <b>a.</b> AM, <b>b.</b> AO, <b>c.</b> TAR	<b>-109-</b>
<b>Figura 5.2.</b> Descomposición en valores singulares de una matriz de datos	<b>-113-</b>
<b>Figura 5.3.</b> Espectros de absorción de AM, AO y TAR a pH ácido, neutro y alcalino	<b>-122-</b>
<b>Figura 5.4.</b> Espectros de AM, AO y TAR a cada pH (ácido, neutro y alcalino)	<b>-123-</b>
<b>Figura 5.5.</b> Espectros seleccionados según SIMPLISMA de la matriz <b>Z</b>	<b>-126-</b>
<b>Figura 5.6.</b> Espectros normalizados recuperados para los tres analitos y para las dos especies desconocidas	<b>-127-</b>
<b>Figura 5.7.</b> Espectros de absorción de las muestras utilizadas	<b>-129-</b>
<b>Figura 5.8.</b> Región Elíptica de Confianza Conjunta (EJCR)	<b>-136-</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2.1. Optimización de las variables FIA del sistema propuesto</i>	<b>-42-</b>
<i>Tabla 2.2. Concentración de ciclamato de sodio en las muestras reales</i>	<b>-44-</b>
<i>Tabla 2.3. Resultados obtenidos por el método propuesto y el método oficial (AOAC)</i>	<b>-45-</b>
<i>Tabla 3.1. Set de calibración para SAC, AC-K y ASP en mg L<sup>-1</sup></i>	<b>-60-</b>
<i>Tabla 3.2. Composición de muestras sintéticas para el set de validación, para SAC, AC-K y ASP (mg L<sup>-1</sup>), su concentración predicha por el modelo PLS-1 y el error relativo de predicción</i>	<b>-61-</b>
<i>Tabla 3.3. Región espectral, número de factores y parámetros estadísticos de la calibración para SAC y AC-K aplicando PLS-1</i>	<b>-69-</b>
<i>Tabla 3.4. Concentración de SAC y AC-K en las muestras reales analizadas</i>	<b>-72-</b>
<i>Tabla 3.5. Estudio de recuperación en las muestras reales</i>	<b>-74-</b>
<i>Tabla 4.1. Composición de las muestras estudiadas</i>	<b>-91-</b>
<i>Tabla 4.2. Optimización de las variables FIA del sistema propuesto</i>	<b>-97-</b>
<i>Tabla 4.3. Concentración de ácido ascórbico (A.A.) y azúcares totales (A.T.) en las muestras reales analizadas</i>	<b>-100-</b>
<i>Tabla 4.4. Estudio de recuperación de ácido ascórbico (A.A.) y azúcares totales (A.T.) en las muestras reales</i>	<b>-101-</b>
<i>Tabla 5.1. Mezclas sintéticas para AM, AO y TAR</i>	<b>-119-</b>
<i>Tabla 5.2. Valores singulares de la matriz Z</i>	<b>-125-</b>
<i>Tabla 5.3. Porcentajes de recuperación en las mezclas sintéticas</i>	<b>-128-</b>
<i>Tabla 5.4. Concentración, en mg L<sup>-1</sup>, de AM, AO y TAR obtenidas por el método propuesto en las muestras reales estudiadas</i>	<b>-131-</b>
<i>Tabla 5.5. Estudio de recuperación para AM, AO y TAR</i>	<b>-132-</b>
<i>Tabla 5.6. Concentración de AM, AO y TAR, en mg L<sup>-1</sup> en los materiales de referencia</i>	<b>-134-</b>



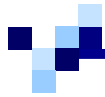
**Tabla 5.7.** *Determinación de AM, AO y TAR en los materiales de referencia por el método propuesto*

**-135-**



# *Capítulo 1*

## INTRODUCCIÓN



## 1.1. ADITIVOS ALIMENTARIOS

Los aditivos alimentarios siguen siendo uno de los temas más desconocidos dentro de la alimentación y que preocupa cada vez más a los consumidores. Aunque se asocian a los tiempos modernos, desde la antigüedad el hombre ha incorporado sustancias a los alimentos con la finalidad de preservarlos y mejorar sus cualidades. Por ejemplo, en el Paleolítico, para disminuir la alteración de los alimentos se los exponía al humo con el propósito de incorporarles las sustancias presentes en él. En el Neolítico, con el desarrollo de la agricultura y la ganadería, se les adicionaban azafrán, sal y vinagre para conservarlos y mejorar su sabor. Posteriormente los egipcios utilizaron colorantes para realzar ciertas características de algunos alimentos y los romanos empleaban salmuera (nitrato potásico), especias y colorantes para conservar y mejorar la apariencia de los mismos.

En los últimos 50 años, los avances tecnológicos y científicos fueron creciendo con el objeto de conservar las cualidades nutricionales y la inocuidad de los productos alimenticios a lo largo de la cadena de elaboración y de distribución, en función de las exigencias del consumidor. Desde el punto de vista tecnológico, se han desarrollado diferentes métodos de conservación: refrigeración, congelación, deshidratación, envasado al vacío, entre otros. Paralelamente, las ciencias biológicas y químicas han descubierto y desarrollado sustancias que permiten que los alimentos continúen siendo seguros, nutritivos y apetecibles en su camino desde el "campo a la mesa".

En la actualidad, toda sustancia natural o sintética que se añade a los alimentos para mejorar el valor nutritivo, asegurar su conservación, mejorar su apariencia en cuanto al sabor y color y potenciar su aroma se la denomina **aditivo alimentario**.

### **1.1.1. Regulación legal de los aditivos**

El empleo generalizado que la industria alimentaria realiza con respecto a los aditivos y la preocupación de los consumidores, obliga a construir mecanismos de control que regulen su correcta utilización.

Para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar caracterizada químicamente y debe superar los controles toxicológicos establecidos por los correspondientes organismos sanitarios. Asimismo, es necesario demostrar que su empleo de lugar a ventajas tecnológicas y beneficios para el consumidor tales como:

- ✓ Conservar la calidad nutritiva de un alimento.
- ✓ Proporcionar alimentos destinados a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales.
- ✓ Aumentar la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas.
- ✓ Favorecer los procesos de fabricación, transformación o almacenado de un alimento, siempre que no se enmascare materias primas defectuosas o prácticas de fabricación inadecuadas.

Existen diversos organismos encargados de la evaluación de los aditivos antes de su aprobación.

En 1963 fue creada la Comisión del **Codex Alimentarius** por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados, tales como Códigos de Prácticas bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias. Las materias principales de este Programa son la protección de la salud de los consumidores, asegurar prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las

organizaciones gubernamentales y no gubernamentales. A escala mundial la Comisión del Codex está preparando actualmente una nueva “Normativa General sobre Aditivos Alimentarios” (GSFA), con el propósito de establecer normas internacionales armonizadas, factibles e incuestionables para su comercio en todo el mundo. Sólo se incluyen los aditivos que han sido evaluados por el Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA).

El Codex Alimentarius define como aditivo alimentario a *“cualquier sustancia que normalmente no se consume como alimento ni se usa normalmente como ingrediente característico del alimento, tenga o no valor nutritivo y cuya adición intencional al alimento con un fin tecnológico (incluso organoléptico) en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetamiento, transporte o conservación de ese alimento, resulta, o es de prever que resulte (directa o indirectamente) en que él o sus derivados pasen a ser un componente de tales alimentos o afecten a las características de éstos”*<sup>[1]</sup>.

El Codex Alimentarius establece un Sistema Internacional de Numeración para los Aditivos Alimentarios. De allí surge el “número INS” para cada aditivo, el cual tiene fines de etiquetado y de información para los consumidores.

Por otro lado, la Comunidad Europea ha aprobado una serie de aditivos conformando la lista del “número E” (Europa), los cuales son estrictamente vigilados y controlados por organismos, como el JECFA y por lo tanto, se consideran autorizados. El sistema de “números E” se utiliza, además, como una manera práctica de etiquetar los aditivos permitidos en todos los idiomas.

En nuestro país, el **Código Alimentario Argentino** define como aditivo alimentario a *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias que directa o indirectamente modifiquen las características físicas, químicas o biológicas de un alimento, a los efectos de su mejoramiento, preservación o estabilización, siempre que:*

- a) *Sean inocuos por sí mismos o a través de su acción como aditivos en las condiciones de uso.*
- b) *Su empleo se justifique por razones tecnológicas, sanitarias, nutricionales o psicosenoriales necesarias.*
- c) *Respondan a las exigencias de designación y de pureza que establezca este Código” [2].*

Además, el Ministerio de Salud de la Nación a través de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y el Instituto Nacional de Alimentos (INAL) en coordinación con las autoridades nacionales y del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) son los que tienen a cargo la aprobación y regulación de los aditivos alimentarios en el ámbito de sus incumbencias. En el ámbito provincial y municipal existen entidades encargadas de ejecutar la reglamentación establecida a nivel nacional y están también a cargo de las inspecciones para corroborar que las plantas elaboradoras de aditivos y las de alimentos cumplan con las normas vigentes. Por su parte, Argentina como país miembro del Mercado Común del Sur (MERCOSUR), ha establecido una reglamentación con relación a aditivos alimentarios por medio de la Cancillería para la concertación de este tema en el ámbito regional [3,4].

### **1.1.2. Seguridad de los aditivos**

Algunos aditivos podrían originar perjuicios para la salud humana (cáncer, alergia, asma, hiperactividad en niños, náuseas y vómitos, dolor de cabeza, erupciones cutáneas, hinchazón, visión borrosa) mientras que la toxicidad de otros no está debidamente establecida. Por ello, los aditivos que se consumen con los alimentos están

sujetos a rigurosos requisitos respecto a su inocuidad y deben ser aprobados por las autoridades sanitarias.

El uso de los aditivos está reglamentado tanto nacional como internacionalmente. Para regular la incorporación de un aditivo a los alimentos es necesario realizar pruebas que garanticen su inocuidad en las dosis debidamente establecidas. El proceso de evaluación de un aditivo pasa por diferentes etapas:

- ✓ Evaluación de su utilidad.
- ✓ Evaluación de los datos de toxicidad disponible tanto en animales como en humanos.
- ✓ Determinación del nivel donde no se observan efectos adversos, NOAEL (*Non Observed Adverse Effect Level*).
- ✓ Determinación de la *Ingesta Diaria Admisible*, IDA.
- ✓ Determinación del nivel máximo de aditivo autorizado.

La toxicidad de una sustancia se define como su capacidad para producir efectos nocivos en un organismo vivo. Esta toxicidad depende de factores tales como: dosis (cantidad de sustancia absorbida), frecuencia de administración (única o repetida), grado de toxicidad de la sustancia y tiempo para que se manifiesten los efectos.

Dadas las exigencias de seguridad que deben cumplir los aditivos, el JECFA, estableció que los aditivos deben someterse a estudios de toxicidad aguda (ensayos a intervalos de 24 horas), de corta duración (ensayos durante un período de hasta 90 días) y crónica (ensayos durante toda la vida o a varias generaciones de animales de vida corta), así como de teratogénesis, de carcinogénesis y mutagénesis.

Para establecer el NOAEL, se tienen en cuenta los datos de toxicidad obtenidos. A partir de este nivel, y utilizando un amplio margen de seguridad se establece la IDA, expresada en mg de aditivo/Kg de peso corporal. La IDA, se define, como *“la cantidad de un aditivo alimentario que puede ser consumida en la dieta diariamente, durante toda la*



*vida, sin que represente un riesgo para la salud*". El JECFA no hace una estimación cuantitativa del riesgo asociado a una ingesta correspondiente a la IDA, sino que establece que el riesgo es tan reducido que puede considerarse mínimo desde el punto de vista de la salud pública. A partir de la IDA, y teniendo en cuenta los hábitos de consumo de la población se establecen los distintos niveles de aditivos autorizados, de tal manera que, no se corra el riesgo de sobrepasar los niveles de seguridad establecidos en la IDA para cada aditivo. Para su cálculo se toma la dosis que no haya causado ningún efecto toxicológico en la especie animal más sensible y se reduce mediante un factor de seguridad para aplicarlo al uso humano. Normalmente se admite un factor de seguridad de 100, aunque en algunos casos también puede utilizarse un factor de 1000.

Cuando la toxicidad del aditivo es tan baja que no representa ningún peligro para la salud, el JECFA no considera necesario establecer una IDA numérica. En esos casos emplea la expresión "*IDA no especificada*".

Por otro lado, el JECFA define "*IDA temporal*" cuando dispone de datos que solo aseguran el empleo de un aditivo durante un cierto período de tiempo. Durante ese período, se deben obtener y evaluar datos relativos a su inocuidad. En caso de que no se disponga de los datos requeridos en el tiempo fijado, la IDA temporal podrá ser retirada por el JECFA en una futura reunión.

### **1.1.3. Funciones y clasificación de los aditivos alimentarios**

La industria alimentaria utiliza los aditivos fundamentalmente por tres razones:

- ✓ Económicas y sociales: mejoran la conservación y preservación de las propiedades iniciales del alimento lo que conlleva a un mayor aprovechamiento de los mismos.

- ✓ Psicológicas y tecnológicas: mejoran el sabor, color y olor del alimento para que sea atractivo al consumidor. Además, los aditivos permiten realizar determinados tratamientos tecnológicos.
- ✓ Nutricionales: impiden el desarrollo de reacciones químicas que disminuyen el valor nutritivo del alimento (por ejemplo, evita la degradación de vitaminas).

Los aditivos alimentarios tienen un papel fundamental a la hora de mantener las cualidades y características de los alimentos que están sometidos a condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, microorganismos) que pueden modificar su composición original. Muchos aditivos alimentarios son sustancias naturales e incluso nutrientes esenciales. Químicamente pertenecen a grupos funcionales muy diversos, entre ellos sales inorgánicas, aminoácidos, hidratos de carbono y enzimas. Los aditivos alimentarios pueden tener varias funciones tecnológicas en un alimento. Las clases funcionales de aditivos alimentarios basados en los Nombres Genéricos y el Sistema Internacional de Numeración (INS) son:

- ✓ **Acidulantes:** incrementan la acidez de un alimento o le confieren un sabor ácido.
- ✓ **Agentes de carga:** aumentan el volumen de un alimento sin contribuir significativamente a su valor energético disponible.
- ✓ **Agentes de recubrimiento:** sustancias que, cuando se aplican en la superficie exterior de un alimento, confieren a éste un aspecto brillante o lo revisten con una capa protectora.
- ✓ **Agentes de tratamiento de la harina:** sustancias, distintas a los emulgentes, que se añaden a la harina o la masa para mejorar su calidad de cocción.

- ✓ **Almidones modificados:** sustancias obtenidas por uno o más tratamientos químicos de almidones comestibles, que pueden haber sufrido un tratamiento físico o enzimático y pueden ser diluidos o blanqueados con ácidos o bases.
- ✓ **Antiaglomerantes:** reducen la tendencia de las partículas de un alimento a adherirse unas a otras.
- ✓ **Antiespumantes:** impiden o reducen la formación de espuma.
- ✓ **Antioxidantes:** sustancias que prolongan la vida útil de los productos alimenticios protegiéndolos frente al deterioro causado por la oxidación.
- ✓ **Colorantes:** sustancias que dan o restituyen color a los alimentos mejorando sus características organolépticas.
- ✓ **Conservantes:** prolongan la vida útil de los productos alimenticios protegiéndolos frente al deterioro causado por los microorganismos.
- ✓ **Correctores de la acidez:** alteran o controlan la acidez o alcalinidad de un alimento.
- ✓ **Edulcorantes:** sustancias diferentes del azúcar que confieren a un alimento sabor dulce.
- ✓ **Emulgentes:** sustancias que hacen posible la formación o el mantenimiento de una mezcla homogénea de dos o más fases no miscibles, como el aceite y el agua, en un alimento.
- ✓ **Endurecedores:** sustancias que vuelven o mantienen los tejidos de frutas u hortalizas firmes o crujientes o actúan junto con agentes gelificantes para producir o reforzar un gel.
- ✓ **Espesantes:** aumentan la viscosidad de un alimento.
- ✓ **Espumantes:** sustancias que hacen posible formar o mantener una dispersión homogénea de una fase gaseosa en un alimento líquido o sólido.

- ✓ **Estabilizadores:** sustancias que posibilitan el mantenimiento del estado físicoquímico de un alimento.
- ✓ **Gases de envasado:** gases distintos del aire, introducidos en un envase antes, durante o después de colocar en él un producto alimenticio.
- ✓ **Gases propelentes:** gases diferentes del aire que expulsan un alimento de un recipiente.
- ✓ **Gasificantes:** sustancias o combinaciones de sustancias que liberan gas y así incrementan el volumen de la masa.
- ✓ **Gelificantes:** dan textura a un alimento mediante la formación de un gel.
- ✓ **Humectantes:** impiden la desecación de los alimentos contrarrestando el efecto de un escaso contenido en agua en la atmósfera, o favorecen la disolución de una sustancia sólida en polvo en medio acuoso.
- ✓ **Potenciadores del sabor:** realzan el sabor y/o el aroma de un alimento.
- ✓ **Sales de fundido:** sustancias que reordenan las proteínas contenidas en el queso de manera dispersa, con lo que producen la distribución homogénea de la grasa y otros componentes.
- ✓ **Secuestrantes:** sustancias que forman complejos químicos con iones metálicos.
- ✓ **Soportes:** sustancias utilizadas para disolver, diluir, dispersar o modificar físicamente de otra manera un aditivo alimentario sin alterar su función tecnológica, y sin ejercer por si mismo un efecto tecnológico, a fin de facilitar su manejo, aplicación o uso.

En esta Tesis se desarrollaron métodos analíticos para la determinación de edulcorantes, antioxidantes y colorantes.

## *Edulcorantes*

Existen dos categorías básicas de edulcorantes:

➤ *Edulcorantes nutritivos*: son aquellos que proveen calorías o energía a la dieta a razón de unas cuatro calorías por gramo, de manera similar a los carbohidratos o las proteínas. Comprenden la sacarosa y otros disacáridos (lactosa, maltosa), monosacáridos (fructosa, glucosa) y polioles de baja energía o alcoholes del azúcar (sorbitol, manitol, xilitol, maltitol). El Código Alimentario Argentino y el Codex Alimentarius, incluyen sólo a los polioles como aditivos alimentarios.

➤ *Edulcorantes no nutritivos*: también denominados edulcorantes de alta intensidad, pueden ofrecer a los consumidores una manera de disfrutar el sabor de la dulzura con poca o ninguna ingesta de energía o respuesta glucémica. Los edulcorantes no nutritivos pueden contribuir al control del peso o de la glucosa en sangre y a la prevención de las caries dentales. La obtención de estos edulcorantes tiene su origen en la búsqueda de edulcorantes para diabéticos. Actualmente está impulsado por el mercado de los productos bajos en calorías, sector que utiliza alrededor del 60 % del total de los edulcorantes sintéticos producidos.

La mayor desventaja de los edulcorantes actualmente utilizados es que no poseen las propiedades funcionales y de sabor del azúcar. Además, pueden presentar algunas de las siguientes limitaciones:

- ✓ Perfiles de sabor dulce diferentes al del azúcar, lo que se manifiesta de diversas formas, tales como retardos en la percepción del sabor, regusto amargo, etc.
- ✓ Limitaciones de estabilidad en las etapas de elaboración y almacenamiento.

Desde el punto de vista tecnológico, la mezcla de edulcorantes provoca un efecto sinérgico que intensifica el sabor dulce general del producto, neutraliza las imperfecciones sensoriales propias de cada edulcorante y reduce la cantidad total de edulcorante que se necesita para obtener el nivel del dulzor lo que se traduce en un menor costo de producción.

### ***Antioxidantes***

Las industrias alimentarias, intentan evitar la oxidación de los alimentos utilizando diferentes técnicas, que van desde el envasado hermético al vacío hasta la adición de sustancias con propiedades antioxidantes.

Los antioxidantes se clasifican en dos grupos, dependiendo de su solubilidad:

- *Hidrofilicos*: solubles en agua, como por ejemplo el ácido ascórbico.
- *Hidrofóbicos*: solubles en lípidos, como por ejemplo el butil hidroxitolueno (BHT).

En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos. Estos compuestos se pueden sintetizar en el cuerpo u obtener de la dieta.

La preocupación por la inocuidad de los aditivos químicos ha estimulado la búsqueda de nuevos antioxidantes, naturalmente presentes en los alimentos o que puedan formarse durante el procesado. Se han encontrado productos con propiedades antioxidantes en numerosas especies: semillas oleaginosas, pulpa y cáscara de cítricos, cáscara de coco, avena, soja, hidrolizado de productos vegetales, proteínas microbianas y de origen animal <sup>[5]</sup>.



## Colorantes

Desde la antigüedad el hombre emplea compuestos naturales procedentes del reino animal, vegetal o mineral con la finalidad de modificar el aspecto de sus alimentos, como por ejemplo azafrán (colorante vegetal de color amarillo obtenido de la planta del azafrán), candy (colorante rojo dulce), las bayas de arándano para colorear el vino, las flores amarillas de renúnculo para colorear mantequilla, orceina (extraído de ciertos líquenes), cochinilla (obtenido de ciertos insectos de la familia Coccidae, parásito de algunos cactus), caramelo (pasta de azúcar hecho almíbar), cúrcuma (extraído del rizoma del cúrcuma), rojo de remolacha (extracto acuoso de la raíz de la remolacha roja), alizarina (obtenida a partir de maderas tropicales) y el índigo (de la planta del índigo o del glasto, arbusto europeo).

Hasta mediados del siglo XIX, se usaron exclusivamente colorantes provenientes de la naturaleza. Posteriormente, se comenzaron a modificar químicamente, cambiando por completo la industria y la economía de estos productos. En 1826, el químico alemán Unverdorben descubrió la anilina como producto de descomposición del índigo <sup>[6]</sup>. Esta molécula sirvió de base para la creación de una serie de colorantes artificiales. En el año 1856, William Perkins sintetizó la mauveina, obtenida por oxidación de la anilina impura y en 1859 la fucsina. Posteriormente, P. Griess descubrió la reacción de diazotación y de copulación, y con ello encontró los colorantes azoicos, que marcaron una nueva era en la síntesis de los colorantes. Alrededor de 1880 Baeyer sintetizó por primera vez el índigo el cual era mucho más puro y barato que el natural. La fabricación del índigo constituyó hasta 1920, el proceso clave de toda la gran industria química. En la actualidad, el 90% de los colorantes empleados son sintéticos.

Puesto que el aspecto visual que brinda un producto frente al consumidor es un factor importante en el momento de adquirir un alimento, la industria alimentaria,

adiciona un colorante o mezclas de colorantes a los mismos en aquellos alimentos que han sufrido alguna modificación producida por <sup>[7, 8, 9, 10]</sup>:

- ✓ Tratamientos tecnológicos en el proceso de elaboración.
- ✓ Tiempo de almacenamiento.
- ✓ Variaciones físicoquímicas.
- ✓ Efectos bioquímicos.

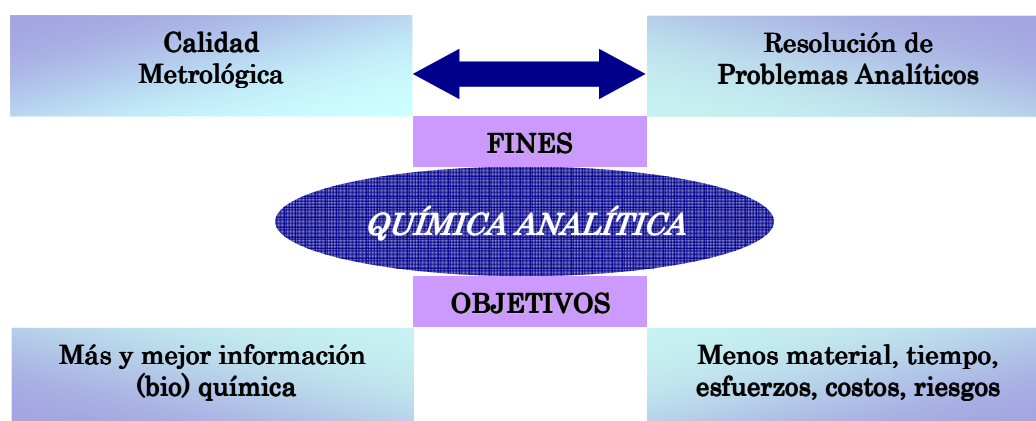
Todos estos cambios hacen que el producto sea menos atractivo para el consumidor. Sin embargo, su uso no debe emplearse de manera arbitraria y la cantidad agregada en cada alimento se realiza con la finalidad de <sup>[10]</sup>:

- ✓ Impartir color a los alimentos elaborados (color de fantasía).
- ✓ Reforzar los colores propios del alimento.
- ✓ Conseguir uniformidad de color, logrando una homogeneidad en el mercado.
- ✓ Crear alimentos más apetecibles asociando sabores y colores.



## 1.2. AUTOMATIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La Química Analítica tiene como finalidad asegurar un alto nivel de exactitud (trazabilidad) en los resultados generados con el nivel de incertidumbre deseado (calidad metrológica). Esta ciencia metrológica debe resolver problemas analíticos generados por problemas económico-sociales o científicos-técnicos, lo que implica satisfacer los requerimientos y las exigencias de la información (bio) química <sup>[11]</sup>. Por lo tanto, los objetivos de la Química Analítica pueden resumirse como la obtención de más y mejor información (bio) química utilizando menos material, tiempo, esfuerzo, costo y riesgo para el operador y el medio ambiente (*Figura 1.1.*) <sup>[11]</sup>.



*Figura 1.1. Finalidades y objetivos de la Química Analítica*

El reemplazo parcial o completo de la intervención humana en los procesos analíticos es una tendencia que comenzó a crecer a partir de 1960. En los años ochenta, la tendencia a la automatización en Química Analítica, se consideraba una gran novedad, pero su introducción ha sido sistemática y creciente, por ello hoy día es raro encontrar herramientas o procedimientos analíticos que no tengan incorporada la automatización <sup>[11]</sup>.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), define automatización como “*el empleo combinado de dispositivos, aparatos e instrumentos para sustituir, mejorar o suplementar el esfuerzo, los sentidos y la inteligencia humana*”

en el desarrollo de un proceso. El sistema puede incluir un elemento de decisión no humano, denominado de retroalimentación (*feed-back*) para controlar alguna de sus operaciones más relevantes” [11]. Esta definición permite distinguir entre sistemas automáticos y automatizados, los cuales reflejan dos grados diferentes de reducir la intervención humana:

- *Sistemas automáticos:* son aquellos que originan acciones previamente programadas por el operador para ser llevadas a cabo en determinados momentos del proceso sin la intervención humana. El sistema no toma decisión por si mismo, sigue siempre la misma secuencia de operación y no tiene incorporado un sistema “*feed-back*”.
- *Sistemas automatizados:* son sistemas automáticos que tienen incorporado un elemento de “*feed-back*” que toma decisiones en determinados momentos de la operación sin la intervención humana. Este tipo de sistema se autocontrola y autoajusta y la secuencia de operaciones puede ser diferente según la situación.

La tendencia a la automatización, se vio afectada, no sólo por las demandas sociales, por obtener la información analítica más rápida, sino también por la necesidad del laboratorio de responder rápidamente a dichas demandas. Por ello, tanto la sociedad como los laboratorios de rutina, exigen la disposición de métodos que se caractericen por [12]:

- ✓ Ser rápidos, analizando un gran número de muestras en función del tiempo.
- ✓ Determinar varios componentes en la misma muestra.
- ✓ Ser automáticos, tratando de eliminar o minimizar la participación humana.
- ✓ Disminuir el consumo de reactivos y/o muestras.
- ✓ Ser simples, puesto que la simplicidad es una de las tendencias actuales más importantes de la Química Analítica.

- ✓ Permitir realizar medidas in-situ.

La automatización de los métodos analíticos permite reemplazar la actividad humana en tareas tediosas e incluso peligrosas para el operador, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano, además de incrementar la velocidad de análisis, ya que hace posible realizar un mayor número de análisis en un menor tiempo.

Los métodos tradicionales para la determinación cuantitativa de los distintos analitos en el análisis de alimentos, utilizan técnicas que, en general, requieren mucho tiempo, insumen cantidades importantes de reactivos de alto costo, generan cantidades considerables de residuos contaminantes y, en la mayoría de los casos, no permiten la integración con otras etapas del proceso analítico.

Por estas razones y debido al creciente número de controles analíticos requeridos en área de salud, medio ambiente y alimentación surge la necesidad de automatizar los procesos analíticos, implementando procedimientos de análisis más rápidos, automáticos o automatizados, de manera de minimizar el tiempo, costo y consumo tanto de reactivos como de muestra.

Los métodos automáticos de análisis suelen clasificarse en <sup>[11]</sup>:

- *Discontinuos*: las muestras se mantienen separadas en recipientes individuales dando lugar a las diferentes etapas del proceso analítico. Finalmente las muestras se llevan al detector, donde se produce la señal correspondiente. Al utilizarse recipientes separados para cada una de las muestras, no se produce contaminación entre las mismas.
- *Continuos*: la muestra es transportada a través de un flujo de líquido o gas, para luego llegar al detector. Existen dos tipos de analizadores continuos: *segmentado*, en

donde el flujo de muestra es segmentado por burbujas de aire, las cuales se eliminan antes de llegar al detector y *no segmentado*, en donde la muestra es transportada directamente en la corriente de flujo de la solución portadora. Estos sistemas permiten realizar un mayor número de análisis en menor tiempo, siendo de importancia en laboratorios de rutina.

➤ *Robotizados*: se utilizan robots de alta precisión que mimetiza las operaciones llevadas a cabo por el ser humano.

### 1.2.1. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

En los Capítulos 2 y 4 de la presente Tesis se empleó la Metodología de **Análisis por Inyección en Flujo (FIA)**, introducida por Ruzicka y Hansen en 1975 <sup>[13]</sup>.

Esta metodología se caracteriza por su simplicidad, el empleo de instrumental económico, fácil de operar, rapidez, ahorro de reactivos, costo y flexibilidad. Todas las virtudes antes mencionadas proporcionan resultados excelentes, rápidos y precisos <sup>[14,15]</sup>.

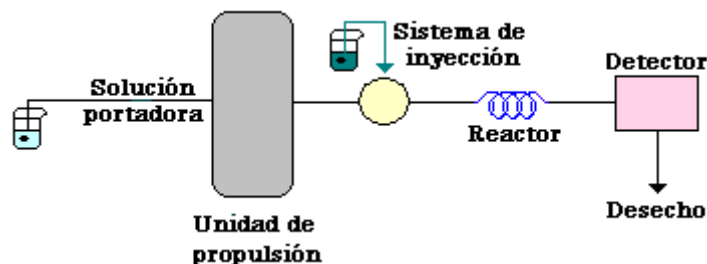
La tendencia del FIA es disminuir los pasos de pretratamiento de muestra y miniaturizarlos de forma automatizada para que los errores de manipulación sean menores y aumente la precisión de los resultados. De esta manera es posible llevar a cabo varias determinaciones de una misma muestra en un tiempo menor de análisis lo que conlleva a una gran disminución de reactivos y por lo tanto, de desechos, claves para mejorar el control de calidad de las mediciones analíticas <sup>[16]</sup>.

Esta metodología se basa en la inserción y dispersión controlada de un determinado volumen de muestra dentro de una corriente de solución portadora que transporta el volumen de muestra hacia el detector. Durante su transporte pueden ocurrir distintos procesos fisicoquímicos. Finalmente, la muestra llega al detector donde

se registra la señal analítica. En ese momento la zona de muestra no ha alcanzado el equilibrio químico ni físico. FIA es una técnica que trabaja a tiempo fijo.

Los componentes fundamentales de un sistema FIA básico son (**Figura 1.2**):

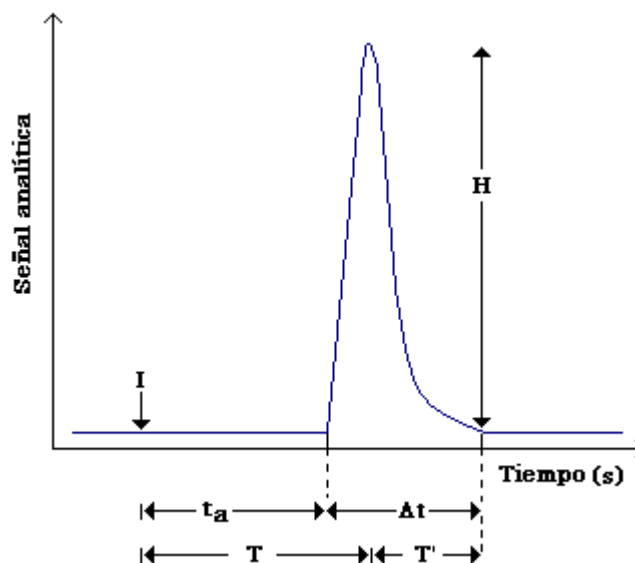
- ✓ **Unidad propulsora**, encargada de ingresar los líquidos al sistema. Esta puede ser: bomba peristáltica, bomba de jeringa, balón de gas a presión, gravedad, etc.
- ✓ **Sistema de inyección**, permite la inserción de un volumen exactamente medido de muestra en una corriente portadora, sin producir alteraciones en el mismo, con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el flujo, como por ejemplo: válvula rotatoria, válvula de conmutación, jeringa y septum.
- ✓ **Reactor**, a través del cual se produce el transporte de la muestra y donde ocurren los procesos fisicoquímicos (reacción química, separación líquido-líquido, separación líquido-sólido, filtración, etc.).
- ✓ **Celda de flujo**, cuyas formas y tamaños dependen del tipo de detección a utilizar. Ésta se acopla a un detector óptico (espectrofotometría de absorción molecular UV-visible e IR, fluorimetría, espectrometría de absorción atómica, etc.) o electroquímico (potenciometría, conductimetría, amperometría, etc.) que permite medir la señal en forma continua. La señal detectada puede ser presentada en un registrador o en un microprocesador.



*Figura 1.2. Componentes de un sistema FIA*

La señal FIA característica, que se obtiene como señal analítica en función del tiempo, es un pico cuyos parámetros más importantes son (*Figura 1.3.*)<sup>[12,14]</sup>:

- ✓ **Altura del pico ( $H$ ):** es la distancia desde la línea de base hasta el máximo del pico. Está relacionada linealmente con la concentración del analito a determinar.
- ✓ **Tiempo de residencia ( $T$ ):** definido como el intervalo de tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta la altura máxima del pico.
- ✓ **Tiempo de retorno ( $T'$ ):** período de tiempo comprendido entre el máximo de pico y el retorno a la línea de base.
- ✓ **Tiempo de transporte  $t_a$ :** período de tiempo comprendido desde la inyección hasta el final de la línea de base.
- ✓ **Tiempo desde la línea de base a la línea de base ( $\Delta t$ ):** definido como el intervalo de tiempo entre el comienzo de la señal analítica y su retorno a la línea de base.



**Figura 1.3.** Parámetros de una señal FIA (*I*: inyección)

La forma característica del pico FIA es una representación gráfica de como se forma el gradiente de concentración de la zona de muestra debido al proceso de dispersión o dilución parcial que sufre la misma durante su transporte a través del sistema. Esta dispersión debe ser controlada manipulando las características geométricas e hidrodinámicas del montaje correspondiente [12].

El fundamento físico del FIA está relacionado con el comportamiento que presenta la muestra cuando es inyectada en la corriente del flujo. Este comportamiento es caracterizado matemáticamente mediante la dispersión, la cual puede definirse como la dilución que sufre un volumen de muestra inyectada en el flujo en un sistema determinado.

Las condiciones de trabajo habituales del FIA ocasionan que el bolo de muestra inyectado no alcance el equilibrio químico ni físico, además de originar que este se diluya (disperse) en la disolución portadora o en el reactivo.

La forma de la señal FIA dependerá del tiempo en el que el bolo de muestra se encuentra dentro del sistema. A tiempos demasiado cortos la dispersión es prácticamente cero y no se genera un gradiente de concentración en el bolo inyectado; a

tiempos de estancia largos ocasionan una dispersión muy acusada originando picos muy anchos. Debido a esto es necesario establecer cual es el tiempo de residencia más adecuado.

Las características del pico dependen de las características hidrodinámicas del sistema FIA, caudal, volumen de inyección, longitud del reactor, etc., siendo difícil establecer un modelo teórico de la dispersión capaz de predecir el comportamiento de un bolo inyectado en una configuración FIA.

Para caracterizar la dispersión en un sistema FIA, suele utilizarse el coeficiente de dispersión propuesto por Ruzicka y Hansen <sup>[15]</sup>. Se trata de una medida directa de la dilución que sufre la muestra cuando pasa por el detector. Se define como la relación matemática de concentraciones del analito antes ( $C_0$ ) y después ( $C$ ) de que haya tenido lugar el proceso de transporte en un determinado sistema FIA:

$$D=C_0/C$$

Este parámetro define el grado de dilución que ha sufrido una muestra en diferentes momentos del transporte. A cada punto del pico FIA le corresponde un coeficiente de dispersión. Cuanto mayor sea  $D$ , menor es la señal obtenida (menor sensibilidad) y más ancho es el pico FIA.



## **1.3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

El objetivo de todo proceso analítico ha sido siempre la búsqueda de nuevos métodos de análisis que permitan multideterminaciones encaminadas a mejorar la sensibilidad, selectividad, rapidez y costo.

En los últimos años, los avances instrumentales, la automatización de métodos analíticos y la incorporación de sistemas informáticos con mayor capacidad de procesamiento, han dado lugar a la aparición de nuevos métodos de análisis capaces de procesar la información generada por los instrumentos, obtener gran cantidad de datos en tiempos muy reducidos y eliminar restricciones de los métodos tradicionales de calibración como las interferencias o el efecto matriz.

La aplicación de estos avances a problemas químicos, permite la obtención y posterior tratamiento de los datos analíticos. Para poder llevar a cabo este tratamiento se requiere de la utilización de herramientas matemáticas y estadísticas.

La disciplina química que emplea el conjunto de estas técnicas se denomina Quimiometría <sup>[17]</sup>.

### **1.3.1. Calibración Multivariada**

Se define calibración multivariada al conjunto de métodos que tienen por objetivo la cuantificación de uno o más componentes en mezclas incógnitas de multicomponentes.

La calibración multivariada ha ido creciendo en los últimos años, revelándose como una herramienta de gran utilidad en una amplia variedad de campos de la investigación, tales como química, física, biológica, entre otros.

Dadas las características actuales de la instrumentación analítica, la calibración multivariada utiliza datos instrumentales para cuantificar o cualificar en forma simultánea dos o más analitos, o un analito en presencia de interferentes.

La calibración multivariada permite determinar simultáneamente varios componentes en una mezcla, reduciendo de esta manera el tiempo de análisis, mejorando la precisión en la predicción (debido a la repetición de múltiples medidas) y permitiendo cuantificar en presencia de interferentes <sup>[18]</sup>.

Existen varios métodos de calibración multivariada, los cuales se pueden clasificar como:

➤ *Aplicables a sistemas lineales:* Regresión Lineal Múltiple (MLR) <sup>[19]</sup>, Cuadrados Mínimos Clásicos (CLS) <sup>[20]</sup>, Cuadrados Mínimos Inversos (ILS) <sup>[21]</sup>, Resolución Multivariada de Curvas optimizado por Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS) <sup>[22]</sup>, entre otros.

➤ *Aplicables a sistemas lineales como no lineales:* Regresión por Componentes Principales (PCR) <sup>[23]</sup>, Cuadrados Mínimos Parciales (PLS) <sup>[24]</sup>, redes neuronales <sup>[25]</sup>, entre otros.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Codex Alimentarius, Norma General para el Etiquetado de Aditivos Alimentarios, CODEX STAN 107-1981.
- [2] Código Alimentario Argentino, Capítulo I, Artículo 6, inciso 3° (2001).
- [3] MERCOSUR / GMC / RES N° 14/93. Lista General Armonizada de Colorantes.
- [4] MERCOSUR / GMC / RES N° 19/93. Lista General Armonizada de Aditivos.
- [5] O. R. Fennema, Química de los Alimentos, Cap. 5, pág. 344, Ed. Acribia, España (2000).
- [6] Plaza & Janes, Diccionario Enciclopédico, Tomo 4, Barcelona, (1989).
- [7] F. Soponar, A. Cătălin Moț, C. Sârbu, J. Chrom. A, 1188, 295 (2008).
- [8] E. C. Vidotti, W. F. Costa, C. C. Oliveira, Talanta, 68, 516 (2006).
- [9] L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández, I. de Orbe, R. Avidad, Talanta, 47, 861 (1998).
- [10] N. Cubero, A. Monferrer, J. Villalta, Aditivos Alimentarios, Cap. Colorantes, págs. 21-22, Ed. Mundi-Prensa Libros, (2002).
- [11] M. Valcárcel, M. S. Cárdenas, Automatización y Miniaturización en Química Analítica, Ed. Springer-Verlag Ibérica, (2000).
- [12] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Automatic Methods of Analysis, Ed. Elsevier, (1988).
- [13] J. Ruzicka, E. Hansen, Anal. Chim. Acta, 78, 145 (1975).
- [14] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Flow Injection Analysis: Principles and Applications. Ellis Horwood, Chichester, (1987).
- [15] J. Ruzicka, E. Hansen, Flow Injection Analysis, 2<sup>da</sup> ed., John Willey & Sons, New York, (1988).
- [16] M. del Pilar Cañizares Macías, Revista de la Sociedad Química de México, Vol. 46, Núm. 2, 167 (2002).

- [17] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Data Handling in Science and Technology 20A: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Ed. Elsevier (1977).
- [18] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. R. Seasholtz, *Chemometrics: A practical guide*, John Wiley & Sons (1998).
- [19] J. Ghasemi, S. Saaidpour, S. D. Brown, *J. Molecular Structure: THEOCHEM*, 805, 27 (2007).
- [20] G. Ragno, C. Vetuschi, A. Risoli, G. Ioele, *Talanta*, 5, 375 (2003).
- [21] M. Blanco D. Serrano, J. L. Bernal, *Talanta*, 50, 527 (1999).
- [22] M. Garrido, I. Lázaro, M. S. Larrechi, F. X. Rius, *Anal. Chim. Acta*, 515, 65 (2004).
- [23] D. L. Death, A. P. Cunningham, L. J. Pollard, *Spec. Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63, 763 (2008).
- [24] M. R. Khoshayand, H. Abdollahi, M. Shariatpanahi, A. Saadatfard, A. Mohammadi, *Spec. Acta Part A* 70, 491 (2008).
- [25] D. Kruzlicova, J. Mocak, B. Balla, J. Petka, M. Farkova, J. Havel, *Food Chemistry*, 112, 1046 (2009).

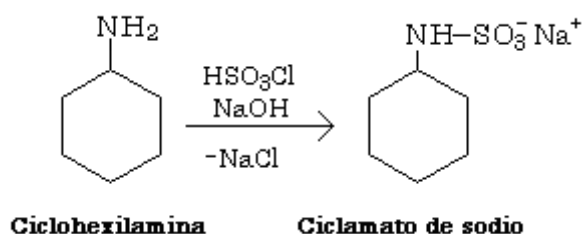


## *Capítulo 2*

DETERMINACIÓN DE  
CICLAMATO EMPLEANDO  
ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN  
FLUJO (FIA) Y DETECCIÓN  
TURBIDIMÉTRICA

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El ácido ciclohexilsulfámico o ácido ciclámico, comúnmente llamado ciclamato, es un edulcorante no calórico, que presenta un poder endulzante entre 30 a 40 veces mayor que la sacarosa. Comercialmente existen las sales de sodio y calcio, pero comúnmente es utilizada la sal de sodio, la cual se obtiene por sulfonación de ciclohexilamina con ácido clorosulfónico, en presencia de hidróxido de sodio (**Figura 2.1**) [1]. El ciclamato de sodio fue sintetizado por primera vez en 1937 por M. Sveda [2] y se lo utiliza como edulcorante artificial desde 1950 [3]. Este edulcorante se emplea, no sólo en bebidas dietéticas y endulzantes de mesa, sino también en productos farmacéuticos, pastelería, postres, lácteos, caramelos, mermeladas y confites. Las características químicas más relevantes son su alta solubilidad en agua (260 g/L a 20 °C) y su termoestabilidad.

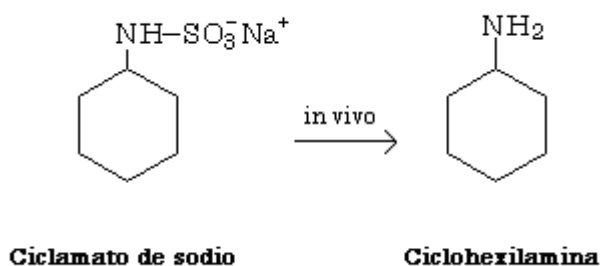


**Figura 2.1.** Obtención de ciclamato de sodio a partir de la sulfonación de ciclohexilamina

Este edulcorante tiene las ventajas de ser económico, indicado para diabéticos, no provoca deterioro dental y es apto para cocinar y hornear por su estabilidad a altas temperaturas. Además, presenta un sabor agradable y no deja gusto amargo como la sacarina.

La combinación de ciclamato de sodio y otros edulcorantes, produce un efecto sinérgico que intensifica el sabor dulce y reduce la cantidad total de edulcorante que se necesita para obtener el nivel de dulzor deseado [4].

La mayor desventaja que presenta el ciclamato de sodio es que no es considerado un aditivo alimentario sin riesgos. Existen trabajos publicados que indican que, tanto el ciclamato de sodio, como sus productos de hidrólisis (ciclohexilamina) producen alteraciones cromosómicas en los fetos y carcinomas en las vejigas de animales de experimentación. En el organismo humano, la flora bacteriana presente en el intestino es la encargada de transformar el ciclamato de sodio en ciclohexilamina (*Figura 2.2.*) [5,6].



**Figura 2.2.** Formación de ciclohexilamina a partir de la hidrólisis del ciclamato

Otros efectos nocivos producidos por la ingestión de este edulcorante en altas dosis, son la elevación de la presión sanguínea y la atrofia testicular [3]. Estos estudios se realizan en animales de experimentación utilizando dosis mucho mayores que las ingeridas por un consumidor habitual, por lo que la extrapolación hacia el ser humano no es viable, y no existe un acuerdo general acerca de la seguridad del ciclamato.

En la década de los setenta numerosos países incluyendo Canadá, Estados Unidos e Inglaterra prohibieron el uso del ciclamato de sodio como aditivo. Posteriormente, su empleo fue aprobado en 1982, por el Comité Conjunto FAO/OMS de

Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA). El Comité de Evaluación del Cáncer de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los EE.UU. confirmó la inocuidad del ciclamato en 1984 y la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos dictaminó lo mismo en 1985. El ciclamato fue aprobado en el año 2000 por el Comité Científico sobre Alimentos (SCF) de la Comisión Europea, actualmente la Autoridad Europea de Seguridad de los Alimentos (EFSA). Sin embargo, la inocuidad del ciclamato de sodio es actualmente tema de discusión.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) para el ciclamato ha sido fijada por el JECFA en 11mg/kg de peso corporal y por el EFSA en 7 mg/kg de peso corporal. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino establece una IDA de 11 mg de ácido ciclámico/kg de peso corporal [7].

Existen numerosos métodos analíticos para la determinación cuantitativa de ciclamato de sodio en muestras de alimentos, entre ellos la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [8,9] y la cromatografía gaseosa (CG) [10].

Por otro lado, en la literatura se proponen métodos utilizando la metodología de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente [11] y empleando titulaciones biamperométricas [12]. Yebra y col. [13] determinan ciclamato de sodio en mezcla de endulzantes artificiales y bebidas dietéticas por espectrometría de absorción atómica (EAA) y análisis por inyección en flujo. En este trabajo el grupo sulfamato es oxidado a sulfato y luego precipitado con una solución de plomo de 1,00 g L<sup>-1</sup>. El plomo del precipitado se determina por EAA, el cual luego se relaciona proporcionalmente con el ciclamato. Otro método que emplea FIA para la determinación de ciclamato en endulzantes, se basa en la conversión de ciclamato a ciclohexilamina, la cual se la hace reaccionar con 1,2-naftoquinona-sulfonato para ser detectado a 480 nm [14]. Gouveia y





col. <sup>[15]</sup> proponen un método aplicando FIA para la determinación de ciclamato en endulzantes y bebidas bajas calorías. Éste consiste en la reacción entre el nitrito y ciclamato en medio ácido, y luego el exceso de agente oxidante (nitrito) es determinado por la reacción de Griess.

Por otro lado, los métodos oficiales como el método Kjeldahl <sup>[16]</sup> o el método oficial propuesto por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) <sup>[17]</sup> son tediosos y consumen mucho tiempo. El método de la AOAC emplea gravimetría y se basa en la oxidación del grupo sulfamato a sulfato con nitrito de sodio en medio ácido y luego su correspondiente precipitación con cloruro de bario. Este tratamiento, que lleva aproximadamente 12 horas de trabajo consta de una serie de pasos tales como agitación, reposo, calentamiento, filtrado, calcinación, etc.

En la actualidad sigue siendo de interés el desarrollo de nuevos métodos analíticos automatizados que permitan la cuantificación del ciclamato de sodio en alimentos dietéticos de modo de evitar su uso excesivo y realizar el control de calidad de los productos que lo contienen. Estos métodos deben ser sencillos, con instrumentación de bajo costo y disponible en los laboratorios de rutina y sin el empleo de solventes tóxicos.

## **2.2. OBJETIVO**

El objetivo de este primer trabajo de Tesis consistió en desarrollar un sistema automático utilizando la metodología FIA con detección turbidimétrica, para la determinación de ciclamato en endulzante de mesa, gaseosas y jugos de fruta, ambos dietéticos.

## **2.3. FUNDAMENTO**

El método se basó en la oxidación del grupo sulfamato presente en el ciclamato, a sulfato <sup>[13]</sup>. Como agente oxidante se utilizó nitrito de sodio en medio ácido (HClO<sub>4</sub>). Posteriormente, el ión sulfato es precipitado con cloruro de bario para su detección turbidimétrica a una longitud de onda de 420 nm.

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1. *Reactivos y soluciones*

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas con drogas y reactivos de calidad analítica y con agua ultra pura (18mΩ) utilizando un sistema de purificación de agua B-pure.

- ☑ Solución patrón de ciclamato de sodio 40 g L<sup>-1</sup>: para preparar esta solución se pesó 2,000 g de ciclamato de sodio (Parafarm) y se llevó a 50,0 mL con agua.
- ☑ Solución de nitrito de sodio 0,2 M: esta solución fue preparada diariamente. Para ello se disolvió 3,45 g de NaNO<sub>2</sub> (Merck) y se llevó a 250,0 mL con agua.
- ☑ Solución de cloruro de bario 30 % (m/v) / polivinil alcohol (PVA) 0,05 % (m/v) / ácido perclórico 5,6 M: para preparar esta solución, primero se midió 120 mL de HClO<sub>4</sub> (Cicarelli, 70 %, δ= 1,68 g mL<sup>-1</sup>) y se llevó a 250,0 mL con agua (solución A). Por otro lado se disolvió 0,025 g de PVA con agua bidestilada hervida. Una vez disuelto el PVA se agregó 15,0 g de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Cicarelli) y se llevó a 50,0 mL con agua (solución B). Preparadas ambas soluciones, se mezcló 50,0 mL de la solución A con 50,0 mL de la solución B.
- ☑ Solución alcalina de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,60 % (m/v) en hidróxido de sodio 0,40 M (solución de lavado del sistema FIA): se pesó 0,60 g de ácido etilendiaminotetraacético (sal disódica) (Anedra), y se llevó a 100,0 mL con NaOH 0,40 M. Para preparar el NaOH se pesó 1,60 g de NaOH (Anedra) y se llevó a 100,0 mL con agua.

- ☑ Soluciones de HCl 0,1, 0,5 y 1,0 M: estas soluciones se prepararon midiendo 829  $\mu\text{L}$ , 4,14 mL y 8,29 mL de HCl (Merck, 37 %,  $\delta= 1,19 \text{ g mL}^{-1}$ ) llevando a 100,0 mL con agua, respectivamente.
- ☑ Las soluciones de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Cicarelli, 85 %,  $\delta= 1,68 \text{ g mL}^{-1}$ ) se prepararon tomando alícuotas correspondientes de este ácido y llevando a volumen con agua.

### 2.4.2. Instrumentación

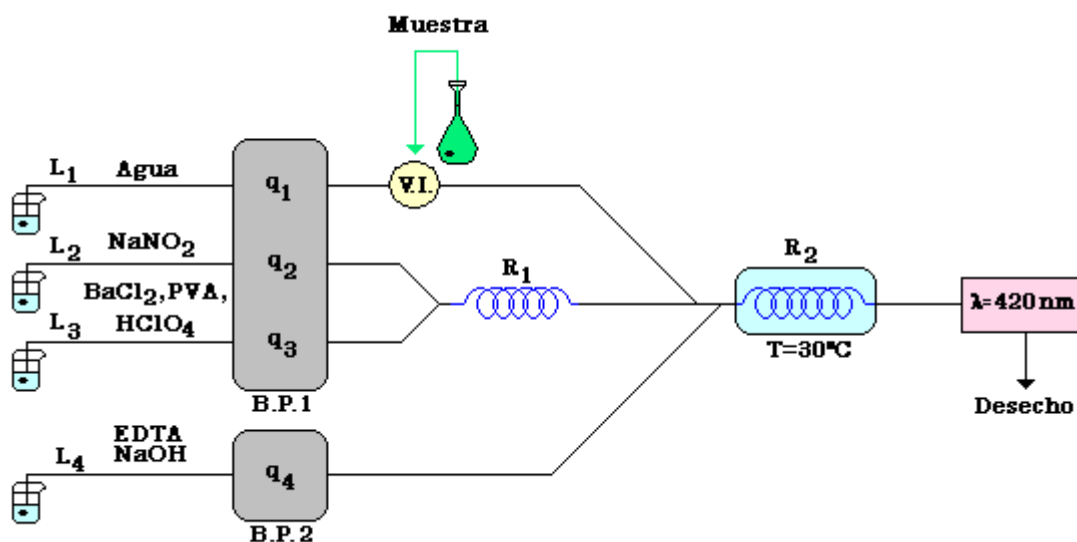
- ☑ Espectrofotómetro UV-V Perkin Elmer Lambda 2S acoplado con un Módulo FIAS 300 Perkin Elmer, con válvula de inyección y dos bombas peristálticas comandadas por una computadora.
- ☑ Celda de flujo Hellma 178-010QS de 18  $\mu\text{L}$  de volumen interno y 10 mm de paso óptico.
- ☑ Termostato Julabo U3 ( $T \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ).
- ☑ Reactores de PoliTetraFluorEtileno (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno.

### 2.4.3. Procedimiento

En la **Figura 2.3.** se observa el sistema de análisis por inyección en flujo empleado para la determinación turbidimétrica de ciclamato.

Para dar inicio a la determinación de ciclamato se enciende la B.P. 1 que permite el ingreso de las soluciones de nitrito de sodio por la línea  $L_2$  y de cloruro de bario-PVA-ácido perclórico por la línea  $L_3$ . Ambas soluciones confluyen en  $R_1$  donde se produce la mezcla de reactivos. La muestra es inyectada por medio de la válvula de inyección (V.I.) en una corriente de agua ( $L_1$ ) y confluye con la mezcla de reactivos en  $R_2$ , produciéndose

la reacción de precipitación. Para favorecer la formación del precipitado de sulfato de bario, el reactor  $R_2$  está sumergido en un baño termostático a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Finalmente se lleva a cabo la detección turbidimétrica a  $420\text{ nm}$ . Antes de la inyección de una nueva muestra se debe limpiar el sistema para evitar que el precipitado formado quede adherido a las paredes de los tubos y a la celda de flujo. Para ello, se detiene B.P. 1 y se enciende B.P. 2, a través de la cual ingresa al sistema por la línea  $L_4$  la solución de lavado de EDTA en NaOH. El sistema se lava durante 20 segundos.



**Figura 2.3.** Sistema FIA para la determinación de ciclamato: B.P. 1, B.P. 2: bombas peristálticas;  $R_1$ ,  $R_2$ : reactores; V.I.: válvula de inyección;  $q_1$ ,  $q_2$ ,  $q_3$ ,  $q_4$ : caudales

#### 2.4.4. Muestras reales

Para la determinación de ciclamato de sodio se utilizaron muestras líquidas y sólidas adquiridas en un comercio local. Las muestras sólidas fueron un endulzante en polvo y un jugo de fruta en polvo, las cuales tienen la ventaja de ser muy solubles en agua. Las muestras líquidas fueron endulzantes, un jugo concentrado y gaseosas.



Las muestras se prepararon realizando la dilución apropiada en agua, teniendo en cuenta el valor de los analitos declarados en el rótulo. Las soluciones así preparadas eran incoloras.

## 2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1. Orden de agregado de reactivos

Para llevar a cabo la determinación de ciclamato se probaron distintos montajes FIA con el fin de establecer el orden de agregado de reactivos. De este estudio se concluyó que, en primer lugar se debe preparar una solución que contenga el  $\text{BaCl}_2$  en medio de  $\text{HClO}_4$  y el agente estabilizante (PVA). Luego a esta solución se le agrega el agente oxidante ( $\text{NaNO}_2$ ) y finalmente la muestra.

### 2.5.2. Optimización de Variables Químicas y FIA

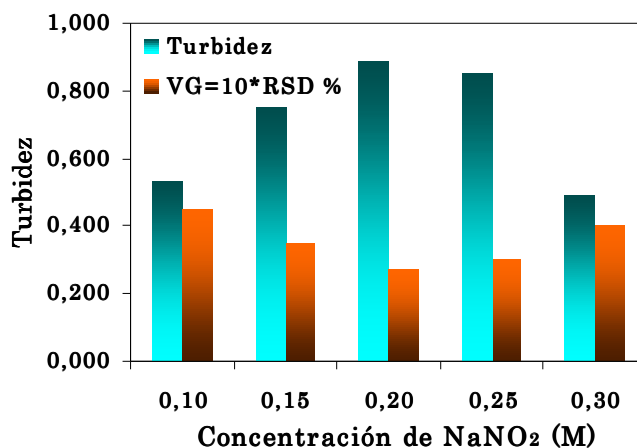
La optimización de las Variables Químicas y FIA del sistema se llevó a cabo por el método univariante y los valores óptimos de las mismas se seleccionaron teniendo en cuenta la estabilidad de la línea de base, la máxima altura de la señal analítica y su reproducibilidad. Dichas optimizaciones se ilustran mediante gráficos de barras. En todos los casos los valores de la desviación estándar relativa % (RSD %) fueron sumamente bajos por lo que el valor graficado (VG) corresponde a diez veces RSD % ( $\text{VG}=10*\text{RSD } \%$ ).

En todos los casos se utilizó una solución de ciclamato de sodio de 0,10 g % (m/v).

### 2.5.2.1. Optimización de Variables Químicas

#### I- Concentración de $\text{NaNO}_2$

La oxidación del grupo sulfamato del ciclamato de sodio a sulfato se llevó a cabo empleando nitrito de sodio como oxidante [17]. Para ello se utilizaron distintas concentraciones de  $\text{NaNO}_2$  entre 0,10 y 0,30 M. Los valores de señal obtenidos se muestran en la **Figura 2.4.** siendo el valor óptimo fue de 0,20 M de  $\text{NaNO}_2$ .

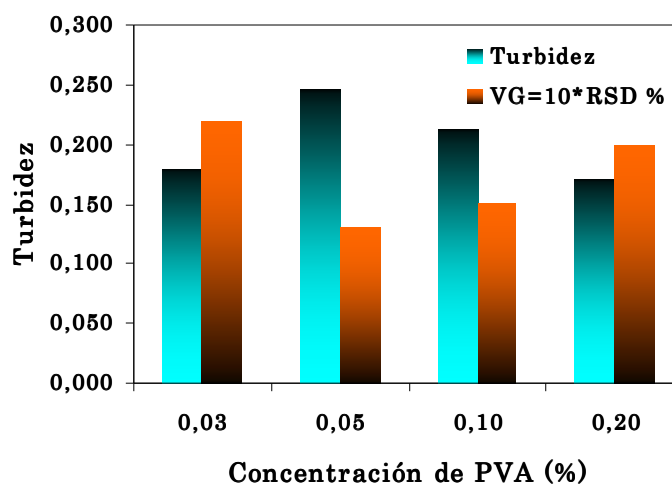


**Figura 2.4.** Optimización de la concentración de  $\text{NaNO}_2$

#### II- Solución de $\text{BaCl}_2$ -PVA- $\text{HClO}_4$

La solución del agente precipitante ( $\text{BaCl}_2$ ) se preparó en medio ácido. Para ello se realizaron determinaciones empleando  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y  $\text{HClO}_4$ . Las señales obtenidas utilizando  $\text{BaCl}_2$  en  $\text{HCl}$  0,10; 0,50 y 1,0 M no fueron reproducibles, y no se obtiene una solución límpida cuando el  $\text{BaCl}_2$  es preparado en medio de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Por otro lado, se obtuvo buena reproducibilidad de las señales, preparando la solución de  $\text{BaCl}_2$  en  $\text{HClO}_4$ . Se probaron concentraciones de  $\text{HClO}_4$  en un rango de concentraciones de 1,5-7,0 M, siendo la concentración óptima 5,6 M.

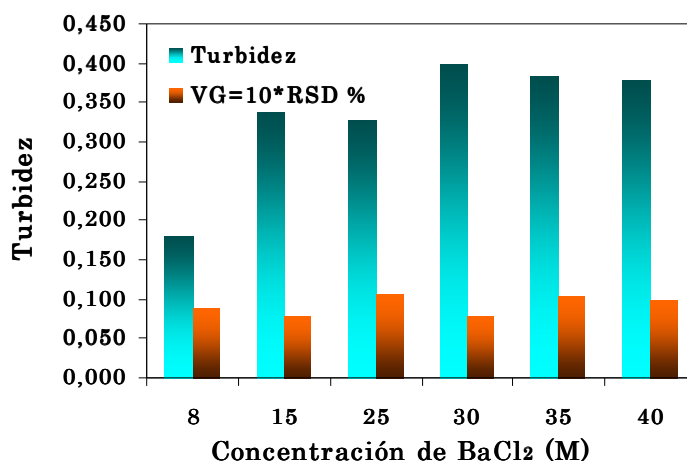
Para mejorar la reproducibilidad de la señal se debió adicionar un agente estabilizante a la solución de cloruro de bario en medio ácido. Se estudió el agregado de gelatina, polivinil alcohol (PVA), almidón y KCl/HCl. La mejor reproducibilidad de la señal se obtuvo cuando se utilizó PVA. Este estabilizante se estudió en un intervalo de concentraciones entre 0,03-0,20 % (m/v). En la **Figura 2.5.** se observa que la concentración óptima de PVA fue 0,05 % (m/v).



**Figura 2.5.** Optimización de la concentración de PVA

La concentración de BaCl<sub>2</sub> se estudió en un rango de concentraciones entre 8-40 % (m/v). Como se observa en la **Figura 2.6.**, con concentraciones superiores a 30 % (m/v) la señal no varía significativamente, por lo tanto se decide utilizar esta concentración como óptima.





*Figura 2.6. Optimización de la concentración del BaCl<sub>2</sub>*

### *III- Solución de lavado de EDTA-NaOH*

Uno de los problemas asociados a la determinación turbidimétrica de sulfatos, es el depósito de precipitado de sulfato de bario en las paredes internas de los tubos y en la celda de flujo, lo que genera defectos de la línea de base. Por lo tanto para eliminar este problema se preparó una solución de lavado de EDTA en medio alcalino <sup>[18,19]</sup>, cuya concentración se optimizó en un rango de 0,2-0,8 % (m/v) para el EDTA y de 0,1-0,6 M para el NaOH. Se obtienen como valores óptimos de concentración 0,6 % (m/v) y 0,4 M para el EDTA e NaOH, respectivamente. Se observó que pasando esta solución de lavado durante 20 segundos se lograba limpiar el sistema.

### **2.5.2.2. Optimización de Variables FIA**

#### *I- Longitud del reactor $R_1$*

Este reactor cumple la función de mezclar los reactivos antes de confluir con la muestra. La dimensión del mismo no es crítica, simplemente se busca que la preparación del reactivo en línea sea adecuada. Se probaron reactores de longitudes comprendidas entre 300 mm y 900 mm, obteniéndose una mejor señal analítica y menor RSD % con el reactor de 600 mm.

#### *II- Longitud del reactor $R_2$*

En el reactor  $R_2$  debe producirse la reacción química con formación del precipitado, por consiguiente el reactor debe ser suficientemente largo como para lograr ese efecto. Para ello se utiliza un reactor enrollado lo cual favorece la disminución de la dispersión en la zona de la muestra y la mezcla entre el analito y los reactivos. Se probaron reactores de longitudes comprendidas entre 400 mm y 4200 mm. En la **Figura 2.7** se observa que se obtiene una señal óptima de turbidez utilizando un reactor de 3000 mm. Cabe aclarar que utilizando el reactor de 4200 mm se generaba presión en el sistema.

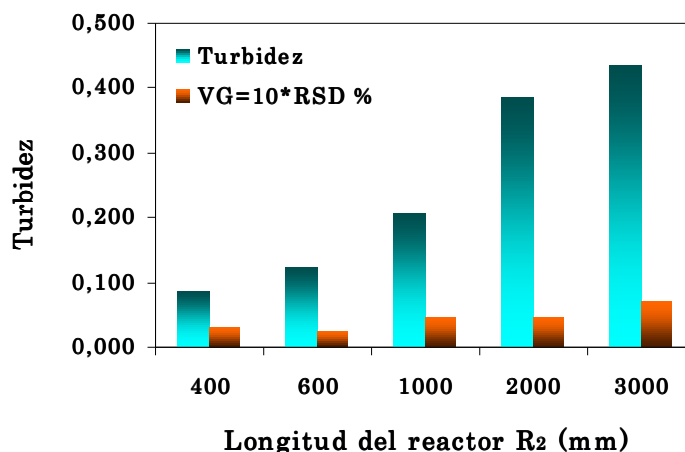


Figura 2.7. Optimización de la longitud del reactor R<sub>2</sub>

### III- Volumen de muestra

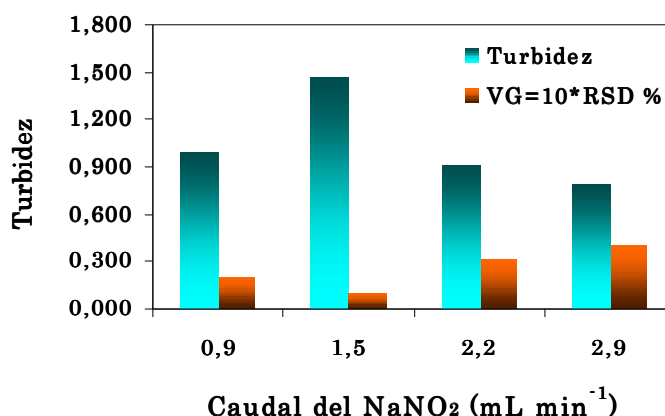
El volumen de muestra a inyectar se estudió para 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$ . Utilizando un volumen de muestra de 100 y 200  $\mu\text{L}$  no se obtuvieron señales reproducibles con las soluciones testigo de mayor concentración. El volumen de muestra óptimo fue 50  $\mu\text{L}$ .

### IV- Caudal de la solución portadora

En todos los casos el caudal se estudió entre 1,4 y 2,9  $\text{mL min}^{-1}$ . Se observó que a bajas velocidades de flujo la línea de base se mantenía constante y la señal aumentaba, a medida que el caudal aumentaba. A valores altos de flujo no se obtuvieron señales reproducibles. Se tomó como óptima una velocidad de flujo de 2,2  $\text{mL min}^{-1}$ .

V- Caudal de la solución de  $\text{NaNO}_2$

La velocidad de flujo del agente oxidante se estudió en un intervalo entre 0,9 y 2,9  $\text{mL min}^{-1}$ . Como se observa en la **Figura 2.8.**, la mejor señal se alcanza cuando la velocidad de flujo es de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ .



**Figura 2.8.** Optimización del caudal del agente oxidante

VI- Caudal de la solución de  $\text{BaCl}_2$ -PVA- $\text{HClO}_4$

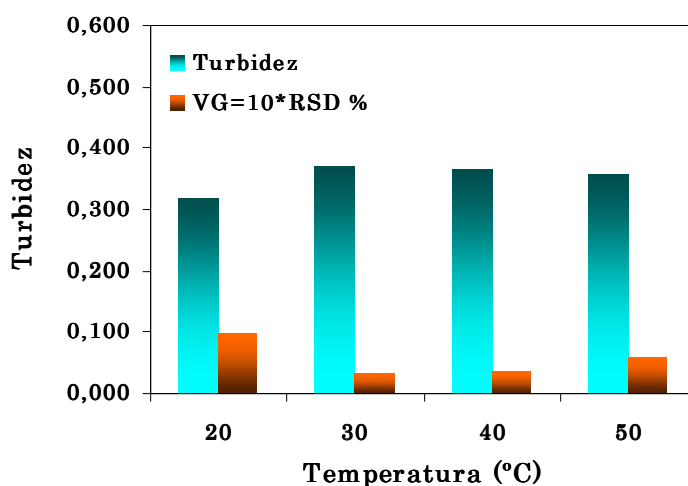
Para la solución de cloruro de bario-PVA-ácido perclórico, se optimizó la velocidad de flujo en un intervalo entre 1,4 y 2,9  $\text{mL min}^{-1}$ , obteniéndose como valor óptimo 1,9  $\text{mL min}^{-1}$ .

VII- Caudal de la solución de EDTA- $\text{NaOH}$

Con la finalidad de eliminar la deriva de la línea de base causada por la adhesión de sulfato de bario en los reactores y la celda de flujo se emplea una solución de lavado del sistema. Se seleccionó un caudal de la solución de lavado de 4,9  $\text{mL min}^{-1}$  lo cual permite arrastrar el precipitado adherido y obtener una elevada frecuencia de muestreo [20]. Este lavado se realiza luego de cada determinación.

### 2.5.3. Optimización de la temperatura de formación del precipitado

Dado que la formación del precipitado se ve favorecida al aumentar la temperatura, se sumerge el reactor R<sub>2</sub> en un baño de agua termostaticado. La temperatura del baño se estudió en un rango de 20-50 °C. En la **Figura 2.9**, se observa un aumento de la señal a 30 °C, siendo ésta la temperatura de trabajo seleccionada. A temperaturas mayores la señal se mantiene prácticamente constante.



**Figura 2.9.** Optimización de la temperatura óptima de trabajo

En la **Tabla 2.1**, se presenta un resumen de la optimización de las Variables Químicas y FIA. Se pueden apreciar los intervalos estudiados y los valores óptimos para cada una de las variables involucradas.



Tabla 2.1. Optimización de las variables del sistema FIA propuesto

VARIABLE	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Longitud del reactor R <sub>1</sub> (mm)	300-900	600
Longitud del reactor R <sub>2</sub> (mm)	400-4200	3000
Volumen de muestra (μL)	50-200	50
q <sub>1</sub> (Caudal portador) (mL min <sup>-1</sup> )	1,4-2,9	2,2
q <sub>2</sub> (Caudal NaNO <sub>2</sub> ) (mL min <sup>-1</sup> )	0,9-2,9	1,5
q <sub>3</sub> (Caudal BaCl <sub>2</sub> /PVA/HClO <sub>4</sub> ) (mL min <sup>-1</sup> )	1,4-2,9	1,9
q <sub>4</sub> (Caudal solución de lavado) (mL min <sup>-1</sup> )	-----	4,9
Concentración de NaNO <sub>2</sub> (M)	0,1-0,3	0,2
Concentración de HClO <sub>4</sub> (M)	1,5-7,0	5,6
Concentración de PVA (%) (m/v)	0,03-0,2	0,05
Concentración de BaCl <sub>2</sub> (%) (m/v)	8-40	30
Concentración de EDTA % (m/v)/NaOH (M)	0,2-0,8 / 0,1-0,6	0,6 / 0,4
Temperatura (°C)	20-50	30

#### 2.5.4. Interferencias de otros aditivos

Este método se llevó a cabo en endulzantes de mesa, gaseosas y jugos dietéticos por lo tanto se prueban como interferentes los distintos compuestos químicos que comúnmente se encuentran en estas matrices. Las determinaciones se realizan sobre un testigo de ciclamato de sodio de 0,10 g % (m/v). Los interferentes estudiados fueron: sacarosa (3 % (m/v)), glucosa (3 % (m/v)), citrato (5 % (m/v)), ácido ascórbico (0,05 % (m/v)), benzoato de sodio (0,05 % (m/v)), fosfato (0,01 % (m/v)), carbonato (0,05 % (m/v)), sacarina (0,02 % (m/m)), acesulfame-K (0,02 % (m/v)). Se demostró que dichas especies químicas no presentan interferencia considerando para ellas un error relativo menor al 5 % respecto al analito.

### **2.5.5. Parámetros analíticos**

Con el sistema FIA optimizado y fijadas las condiciones experimentales, se procede a realizar la curva de calibrado (**Figura 2.10**). El rango lineal de concentraciones está comprendido entre 0,015-0,120 g de ciclamato de sodio % (m/v). La curva de calibrado obtenida es  $S = (7,792 \pm 0,179) C - (0,114 \pm 0,012)$ ,  $R^2 = 0,999$ , siendo S la señal de turbidez y C, la concentración de ciclamato de sodio en g % (m/v).

Se estima la reproducibilidad del método propuesto, a partir de las pendientes de nueve curvas de calibrado obtenidas en diferentes días y condiciones (solución estándar, reactivos, etc.). La media de las pendientes es  $7,520 \pm 0,406$  con un RSD % de 5,9. El límite de detección (LOD) para una relación señal/ruido igual a 3 <sup>[21]</sup> es 0,006 g de ciclamato de sodio % (m/v). El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,02 g de ciclamato de sodio % (m/v) y la frecuencia de muestreo obtenida, teniendo en cuenta el ciclo de lavado, fue de  $45 \text{ h}^{-1}$ .

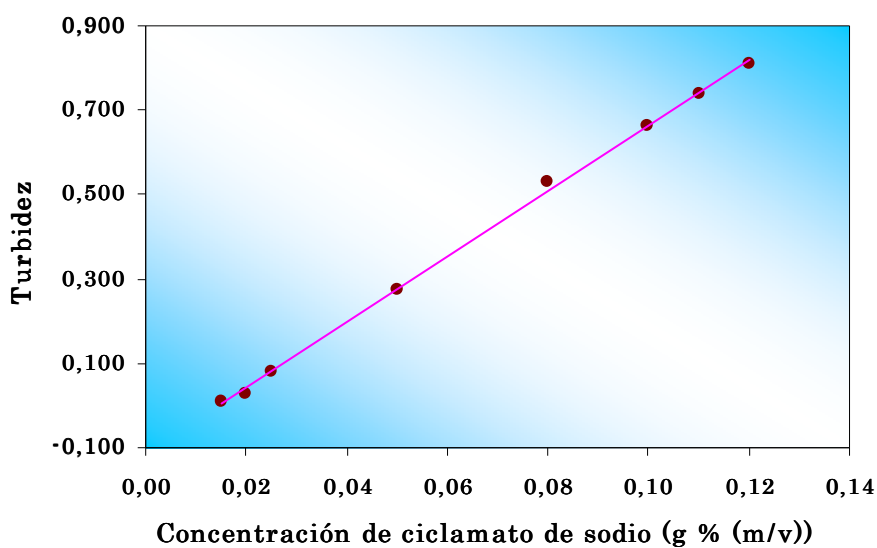


Figura 2.10. Curva de calibrado de ciclamato de sodio a 420 nm

### 2.5.6. Análisis de muestras reales

El método propuesto para la determinación de ciclamato fue aplicado a endulzantes de mesa líquidos y en polvo, gaseosas y jugos de fruta dietéticos. En la **Tabla 2.2.** se presentan las concentraciones de ciclamato de sodio en las muestras, obtenidas por el método propuesto, y las concentraciones declaradas en el rótulo.

**Tabla 2.2.** Concentración de ciclamato de sodio en las muestras reales. Unidades de concentración: a (gramos de ciclamato de sodio %, (m/v)); b (gramos de ciclamato de sodio %, (m/m)); c (mg de ciclamato de sodio %, (m/v)), d (mg de ciclamato de sodio %, (m/m))

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN	
	VALOR OBTENIDO	VALOR ROTULADO
Endulzante líquido 1 <sup>a</sup>	8,74 ± 0,24	8,0
Endulzante líquido 2 <sup>a</sup>	6,31 ± 0,03	6,0
Endulzante en polvo <sup>b</sup>	8,02 ± 0,49	10,0
Gaseosa 1 <sup>c</sup>	29,90 ± 0,08	30,0
Gaseosa 2 <sup>c</sup>	100,0 ± 0,00 <sub>5</sub>	90,0
Jugo concentrado <sup>a</sup>	0,46 <sub>1</sub> ± 0,00 <sub>5</sub>	0,6
Jugo en polvo <sup>d</sup>	58,30 ± 0,15	54,0





### 2.5.7. Validación del método propuesto

Para validar este método se utilizó el método de referencia propuesto por la AOAC [17]. Teniendo en cuenta que las muestras analizadas presentan diferentes contenidos de ciclamato, se aplica un test t por parejas [21] para comparar los resultados obtenidos por el método propuesto y por el método de referencia. El valor de t calculado es 0,41 y el valor de t crítico es 2,45 para n=7 y 95 % de nivel de confianza, por lo tanto se concluye que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos (*Tabla 2.3*).

**Tabla 2.3.** Resultados obtenidos por el método propuesto y el método oficial (AOAC). Unidades de concentración: a (gramos de ciclamato de sodio %, (m/v)); b (gramos de ciclamato de sodio %, (m/m)); c (mg de ciclamato de sodio %, (m/v), d (mg de ciclamato de sodio %, (m/m))

MUESTRAS	MÉTODO PROPUESTO	MÉTODO DE REFERENCIA	ERROR RELATIVO	DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS
Endulzante líquido 1 <sup>a</sup>	<b>8,74 ± 0,24</b>	8,72 ± 0,04	+ 0,23	+ 0,02
Endulzante líquido 2 <sup>a</sup>	<b>6,31 ± 0,03</b>	6,50 ± 0,04	- 2,92	- 0,19
Endulzante en polvo <sup>b</sup>	<b>8,02 ± 0,49</b>	8,10 ± 0,40	- 0,99	- 0,08
Gaseosa 1 <sup>c</sup>	<b>29,90 ± 0,08</b>	29,50 ± 1,45	+ 1,35	+0,40
Gaseosa 2 <sup>c</sup>	<b>100,0 ± 0,005</b>	97,30 ± 0,22	+ 2,77	+ 2,70
Jugo concentrado <sup>a</sup>	<b>0,461 ± 0,005</b>	0,465 ± 0,007	- 0,86	+ 4x10 <sup>-3</sup>
Jugo en polvo <sup>d</sup>	<b>58,30 ± 0,15</b>	59,80 ± 0,65	- 2,51	- 1,50
				<b>d= 0,19</b>

## **2.6. CONCLUSIONES PARCIALES**

El método de referencia para la determinación de ciclamato consta de una serie de pasos tediosos tales como agitación, reposo, calentamiento, filtrado, calcinación, etc., los cuales insumen mucho tiempo (aproximadamente 12 horas). Por otro lado, en la literatura se proponen métodos analíticos que utilizan compuestos tóxicos que pueden producir contaminación medioambiental.

En este trabajo de Tesis se propone, para la determinación de ciclamato en endulzantes de mesa, gaseosas y jugos de fruta, ambos dietéticos, un método automatizado con detección turbidimétrica que posee las ventajas de ser rápido, de bajo costo, sensible, fácil de implementar y con una alta frecuencia de muestreo. Posee la ventaja adicional de que las muestras analizadas no requieren tratamiento previo y la presencia de otros aditivos y edulcorantes que se encuentran en las muestras comerciales no interfieren significativamente.

El método propuesto se validó frente al método de referencia AOAC obteniéndose resultados muy satisfactorios.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] H. Beyer, J. Barluenga Mur, W. Walter, Manual de Química Orgánica, pág. 607, Ed. Reverté S. A., España (1987).
- [2] L. F. Audrieth, M. Sveda, *J. Org. Chem.*, 9, 89 (1975).
- [3] S. Takayama, A. G. Renwick, S. L. Johansson, U. P. Thorgeirsson, M. Tsutsumi, D. W. Dalgard, S. M. Sieber, *Toxic. Sciences*, 53, 33 (2000).
- [4] Z. Huanga, J. Mab, B. Chenb, Y. Zhang, S. Yao, *Anal. Chim. Acta*, 555, 3 (2006).
- [5] A. G. Renwick, *Xenobiótica*, 16, 1057 (1986).
- [6] O. R. Fennema, *Química de los Alimentos*, Cap. 12, pág. 939, Ed. Acribia, España (2000).
- [7] Código Alimentario Argentino, Capítulo XVII, Artículo 1348 (actualizado al mes de julio de 2008).
- [8] Q. C. Chen, S. F. Mou, K. N. Liu, Z. Y. Yang, Z. M. Ni, *J. Chrom. A*, 771, 135 (1997).
- [9] M. M. F. Choi, M. Y. Hsu, S. L. Wong, *Analyst*, 125, 217 (2000).
- [10] J. A. W. Dalziel, R. M. Johnson, A. J. Shenton, *Analyst*, 97, 719 (1972).
- [11] I. M. Psarellis, E. G. Saratonis, A. C. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 272, 265 (1993).
- [12] O. Fatibello Filho, M. D. Capelato, S. A. Calafatti, *Analyst*, 120, 2407 (1995).
- [13] M. C. Yebra, P. Bermejo, *Talanta*, 45, 1115 (1998).
- [14] C. Cabero, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, *Anal. Chim. Acta*, 381, 307 (1999).
- [15] S. T. Gouveia, O. Fatibello, J. D. Nobrega, *Analyst*, 120, 2009 (1995).
- [16] United States Pharmacopeia, pág. 115, 16<sup>th</sup> ed., (1960).
- [17] Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Vol. 2, pág. 1168, 15<sup>th</sup> ed., Arlington, USA, (1990).
- [18] J. F. Van Standen, R. E. Taljaard, *Anal. Chim. Acta*, 331, 271 (1996).



- [19] J. A. Vieira, B. F. Reis, E. A. M. Kronka, A. P. S. Paim, M. F. Giné, *Anal. Chim. Acta*, 366, 251 (1998).
- [20] B. Karlberg, G. E. Pacey, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Flow Injection Analysis: A Practical Guide*, Vol. 10, Ed. Elsevier (1989).
- [21] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Data Handling in Science and Technology 20A: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Ed. Elsevier (1997).



## *Capítulo 3*

DETERMINACIÓN  
SIMULTÁNEA DE SACARINA Y  
ACESULFAME-K UTILIZANDO  
ESPECTROMETRÍA UV Y PLS-1

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La sacarina (SAC) (sal de sodio de 1,2 benzisotiazolin-3-ona-1,1dióxido u o-benzosulfamida) es un edulcorante no calórico, descubierto accidentalmente en 1878 por Fahlberg estudiando la oxidación de la ortotoluensulfonamida <sup>[1,2]</sup>. Este descubrimiento fue publicado por Fahlberg y Remsen un año después <sup>[3,4]</sup> y posteriormente se comenzó a producir a escala industrial.

Entre las características más relevantes de la sacarina se pueden destacar su poder endulzante (entre 300 a 500 veces más dulce que la sacarosa) y su resistencia al calentamiento, por lo que se la utiliza para la elaboración de alimentos. Por ser poco soluble en agua se utilizan sus sales de sodio (**Figura 3.1. a.**) o calcio <sup>[2,5,6]</sup>, aunque la más utilizada es la sal de sodio. Este edulcorante puede ser consumido por pacientes diabéticos y no provoca caries dentales. Su principal desventaja es que presenta un sabor amargo y metálico, fundamentalmente cuando se la utiliza en altas concentraciones. Por ello, generalmente se la emplea junto a otros edulcorantes para mejorar sus características organolépticas.

En 1970 estudios experimentales demostraron que la sacarina, en altas dosis, producía cáncer de vejiga en ratas <sup>[7]</sup>. En el año 1972 la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos retira la sacarina del listado de aditivos seguros <sup>[8]</sup> y posteriormente prohíbe su uso. Sin embargo, esa prohibición es anulada en 1991. Actualmente, aunque el debate sobre su inocuidad no ha finalizado, la sacarina está aprobada en más de 90 países y se la utiliza en productos farmacéuticos y alimenticios <sup>[9]</sup>. La sacarina fue aprobada en 1993 por el Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y en 1995 por el Comité Científico sobre Alimentos (SCF) de la Comisión Europea (actualmente la Autoridad Europea de Seguridad de los

Alimentos (EFSA)).

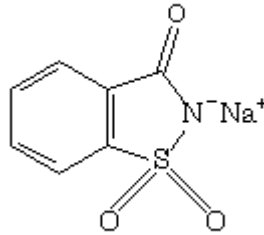
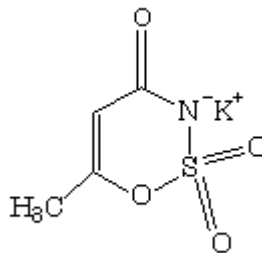
La Ingesta Diaria Admisible (IDA) para la sacarina ha sido fijada por el JECFA en 5 mg/kg de peso corporal <sup>[10]</sup>. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino establece una IDA de 2,5 mg/kg de peso corporal de sacarina expresada como ácido <sup>[11]</sup>.

El acesulfame-K (AC-K), químicamente la sal potásica del 6-metil-1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido (**Figura 3.1. b.**), es un edulcorante no calórico aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa y fue descubierto en 1967. Tiene la propiedad de ser soluble en agua a temperatura ambiente, no es higroscópico y es estable a altas temperaturas. Al igual que la SAC, no provoca caries dentales y puede ser consumido por pacientes diabéticos.

Este edulcorante, por si mismo, tiene un resabio amargo y metálico. Sin embargo, presenta un notable efecto sinérgico al combinarse con otros edulcorantes.

El acesulfame-K no es metabolizado ni acumulado en el cuerpo humano y es excretado en forma rápida y completa por el mismo, lo que lo hace apto para diabéticos. Por otro lado no hay estudios que avalen su inocuidad a largo plazo. La FDA reconoce que el acesulfame-K puede contener cloruro de metileno, un carcinógeno conocido, y que las pruebas presentadas por la compañía que lo fabrica (Hoechst) eran “menos que adecuadas” <sup>[12,13]</sup>. Sin embargo, la FDA en 1988 aprobó su uso y en 1998 fue autorizado su empleo en bebidas bajas calorías.

La IDA para el acesulfame-K ha sido fijada por el JECFA en 15 mg/kg de peso corporal <sup>[10]</sup>. En el ámbito europeo la EFSA declara que la IDA es de 9 mg/kg de peso corporal <sup>[14]</sup>.

**a.****b.**

**Figura 3.1.** Estructura química de: **a.** sacarina y **b.** acesulfame-K

A pesar de que la SAC y el AC-K son ampliamente utilizados como sustitutos del azúcar, son potencialmente tóxicos, por lo que se debe realizar un control de calidad sobre los productos que los contienen.

Buchgraber y col. <sup>[15]</sup> plantean la determinación de estos edulcorantes en alimentos, aplicando cromatografía líquida de alta resolución detectando la luz dispersada (HPLC-ELSD). El procedimiento incluye pasos de extracción y *clean-up* de la muestra empleando extracción en fase sólida previos a la detección.

Por otro lado, como alternativa a la tradicional HPLC, se utiliza la cromatografía iónica con detección UV <sup>[13]</sup>. James y col. <sup>[16]</sup> proponen un método para la determinación de SAC y AC-K en bebidas analcohólicas utilizando cromatografía iónica con generador de eluyente.

La metodología de análisis por inyección en flujo ha sido utilizada por García-





Jiménez y col. para la determinación de varios aditivos en alimentos y cosméticos. El sistema incluye una columna de separación y la utilización de solventes orgánicos. Sin embargo este método no permite la separación simultánea de SAC y AC-K ya que son débilmente retenidos en la columna <sup>[17]</sup>.

El tiempo de análisis, el elevado costo instrumental y la utilización de reactivos inofensivos para el medioambiente, son factores importantes a tener en cuenta cuando se deben analizar SAC y AC-K en un número elevado de muestras. Por ello el desarrollo de métodos analíticos rápidos, sencillos, de bajo costo y que permitan su determinación cuantitativa, sigue siendo un tema de interés.

## **3.2. OBJETIVO**

El objetivo de este segundo trabajo fue desarrollar un método simple, rápido y directo para la determinación simultánea de sacarina y acesulfame-K en endulzantes comerciales y jugos de fruta en polvo.

## **3.3. FUNDAMENTO**

Para llevar a cabo el objetivo de este trabajo se utilizó espectrometría de absorción molecular UV y calibración multivariada (PLS-1) como herramienta quimiométrica.

### **3.3.1. *Regresión por Cuadrados Mínimos Parciales***

El Método de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS) introducido por H. Wold en 1975 <sup>[18]</sup> es el método de calibración más empleado cuando la información instrumental proveniente de cada muestra es de tipo vectorial (un espectro). Este método se basa, al igual que la Regresión por Componentes Principales (PCR), en el Análisis por Componentes Principales (PCA). La demanda por esta metodología y la evidencia de que trabaja bien, van en aumento y así, la metodología PLS está siendo aplicada en muchas ramas de la ciencia.

Este método presenta la ventaja de que permite calibrar, predecir y estudiar estadísticamente los residuos en forma separada para cada componente de una muestra

y es ideal para muestras en las que los componentes tienen intensidades espectrales muy diferentes.

Existen dos tipos de métodos PLS: uno denominado PLS-1, que concentra su atención en un único analito a la vez, y otro llamado, PLS-2, que permite calibrar y predecir las concentraciones de varios analitos simultáneamente. A pesar de que PLS-1 debe repetirse para cada analito diferente de interés, permite optimizar las condiciones de trabajo para cada uno de manera independiente. En general, hoy en día se prefiere utilizar PLS-1 para la mayoría de las aplicaciones.

La posibilidad de calibrar y predecir utilizando el modelo PLS ofrece la alternativa de seleccionar un número apropiado de factores mediante un algoritmo iterativo cíclico. Los factores seleccionados describen la máxima correlación entre la información espectral y vector de concentraciones del analito de interés.

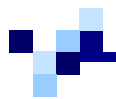
Durante la etapa de calibración se busca un modelo de comportamiento entre dos grupos de variables,  $y=f(x)$ , (los espectros y las concentraciones de los componentes de referencia) con la finalidad de obtener una relación entre ellas, mediante un modelo matemático que se debe ajustar al conjunto de muestras patrón que recibe el nombre de set de calibración. Las concentraciones de los analitos en las mezclas de calibrado deben ser representativas de las combinaciones de concentraciones de analitos que se espera encontrar en las muestras a analizar, y además hay que saber cuáles son las combinaciones más adecuadas. A través del diseño experimental no sólo se obtienen las combinaciones más apropiadas sino también el número de mezclas que hay que analizar.

Para que un modelo cubra las expectativas de predicción esperadas sobre muestras reales, debe sustentarse sobre un adecuado set de calibración, es decir, la bondad como herramienta de predicción del modelo va a depender del diseño del set de calibración. En la etapa de predicción, a partir de los resultados de la calibración, se



estiman las concentraciones de los analitos en las muestras incógnitas (set de predicción).

Para seleccionar el número óptimo de factores, en la etapa de calibración, se aplica el método de validación cruzada, el cual consiste en calibrar el modelo con todas las muestras de calibración excepto una, predecir la concentración de la muestra dejada de lado, y calcular el error cometido (diferencia entre el valor nominal y el predicho). Este cálculo se realiza utilizando un número creciente de factores, hasta un cierto máximo, el cual puede establecerse a voluntad y debe ser menor al número de mezclas de calibración. Este procedimiento se repite hasta que todas las muestras de calibrado hayan sido dejadas de lado una sola vez. En cada caso se predice la concentración del analito en cada una de las muestras. Para cada número de factores, se calcula la suma de los cuadrados de los errores de predicción (PRESS), el cual nos da una medida de lo bien que una matriz de cálculo (calibración) está determinando la concentración para cada número de factores tenidos en cuenta. Luego se procede a estudiar cómo varía el PRESS así obtenido en función del número de factores mediante un procedimiento estadístico. Se observa que, si se emplean menos factores que los necesarios se obtiene una situación llamada *subajuste* de los datos, por el contrario, emplear más factores que lo debido puede llevar a una situación llamada *sobreajuste*. Por lo tanto para evitar estas situaciones se elige el número óptimo de factores aplicando el criterio de Haaland y Thomas <sup>[19]</sup>. Este criterio propone seleccionar como número óptimo de factores el primer valor para el que la probabilidad asociada disminuye por debajo de 0,75.



### 3.3.2. *Diseño de Experimentos*

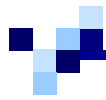
El Diseño de Experimentos tuvo su inicio teórico a partir de 1935 por Sir Ronald A. Fisher, quién sentó la base de la teoría del Diseño Experimental. Actualmente las aplicaciones son múltiples, especialmente en la investigación de las ciencias naturales, ingeniería, laboratorios y casi todas las ramas de las ciencias sociales.

El Diseño Estadístico de Experimentos (DEE), también denominado diseño experimental, propone obtener la optimización de un proceso o producto con un número reducido de experimentos, con la máxima eficiencia. El DEE es una técnica orientada a problemas multivariados ya que un método analítico es, en sí mismo, un procedimiento o proceso, en el cual interviene un número considerable de variables (concentraciones de reactivos, parámetros instrumentales, pH, tiempos de reacción, etc.) y todas ellas deben ser ajustadas para obtener una óptima respuesta (máxima intensidad de señal, óptima separación de picos, mínimo error relativo, etc.).

El propósito de un diseño experimental es proporcionar métodos que permitan obtener la mayor cantidad de información válida acerca de una investigación, teniendo en cuenta el factor costo y el uso adecuado del material disponible mediante métodos que permitan disminuir el error experimental.

El diseño experimental involucra dos contextos:

- ✓ Describir la serie de experimentos que será llevada a cabo con la intención de desarrollar un modelo (por ejemplo un modelo de regresión).
- ✓ La optimización de procesos o productos se aplica para determinar la serie de condiciones que son requeridas para obtener un resultado con características deseables u óptimas.



En esta Tesis se empleó un diseño factorial completo de dos niveles (two-level full factorial design “FFD”) para determinar el número de experimentos que se deben realizar al aplicar PLS.

### 3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.4.1. *Reactivos y soluciones*

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas con drogas y reactivos de calidad analítica y con agua ultra pura (18m $\Omega$ ) utilizando un sistema de purificación de agua B-pure.

- Solución patrón de sacarina 1000 mg L<sup>-1</sup>: se pesó 0,1000 g de sacarinato de sodio (Parafarm) y se llevó a 100,0 mL con agua.
- Solución patrón de acesulfame-K 1000 mg L<sup>-1</sup>: se pesó 0,1000 g de acesulfame-K (Fluka) y se llevó a 100,0 mL con agua.
- Solución patrón de aspartamo 1000 mg L<sup>-1</sup>: se pesó 0,1000 g de aspartamo (Parafarm) y se llevó a 100,0 mL con agua.
- Solución reguladora Britton Robinson de diferentes pH: fueron preparadas mezclando volúmenes apropiados de Britton Robinsón ácida (ácido acético (Mallinckrodt), ácido fosfórico (Tejon) y ácido bórico (Sigma) todas de concentración 0,04 M) con NaOH 0,2 M (Cicarelli).
- Solución reguladora Clark y Lubs pH 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,2: se prepararon mezclando volúmenes apropiados de KCl (Anedra) 0,2 M y HCl 0,2 M (Anedra, 37 %,  $\delta= 1,19$  g mL<sup>-1</sup>).
- Solución reguladora biftalato de potasio-ácido clorhídrico (KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-HCl) de pH 3,3: para preparar esta solución se mezcló 50,0 mL de biftalato de potasio (Timper) 0,1 M y 12,38 mL de HCl 0,1 M (Anedra, 37 %,  $\delta= 1,19$  g mL<sup>-1</sup>).

- ☑ Solución reguladora citrato de sodio-ácido clorhídrico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{HCl}$ ) de pH 3,3: se disolvió 21,0 g de ácido cítrico en 200 mL de NaOH 0,1 M. Luego se mezcló 44 mL de la solución de citrato de sodio y 56 mL de HCl 0,1 M (Anedra, 37 %,  $\delta = 1,19 \text{ g mL}^{-1}$ ).
- ☑ Solución reguladora ácido acético-acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} - \text{NaCH}_3\text{CO}_2$ ) de pH 4,0; 5,0; 5,3: se prepararon mezclando volúmenes apropiados de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  (Anedra,  $\delta = 1,049 \text{ g mL}^{-1}$ ) 0,5 M y  $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$  0,5 M (Cicarelli).

### 3.4.2. Instrumentación

- ☑ Espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A con arreglo lineal de diodos y ancho de banda espectral de 2 nm.
- ☑ Celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico (NSG Precision Cells, Inc.).
- ☑ Electrodo de vidrio Ross Sure Flow 8172, conectado al pHmetro Orion research model 701A/digital ionalyzer, fue utilizado para realizar medidas potenciométricas de pH.

### 3.4.3. Conjunto de calibración y validación

Para aplicar el modelo PLS-1 se construye un conjunto de calibración aplicando un diseño factorial completo  $2^3+3$  (tres factores, con dos niveles de concentración y tres centros). El aspartamo, (*sección 3.5.2.*) interfiere en la determinación de sacarina y acesulfame-K por lo tanto se lo incluye en el modelo matemático. Para ello, se utilizó una serie de 11 soluciones estándares en un intervalo de concentraciones de 2-15  $\text{mg L}^{-1}$



para SAC, 2-20 mg L<sup>-1</sup> para AC-K y 2-25 mg L<sup>-1</sup> para ASP. Los intervalos fueron seleccionados teniendo en cuenta el rango de linealidad para cada analito (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1.** Set de calibración para SAC, AC-K y ASP en mg L<sup>-1</sup>

MEZCLA	SAC	AC-K	ASP
C1	2	2	2
C2	15	2	2
C3	2	20	2
C4	15	20	2
C5	2	2	25
C6	15	2	25
C7	2	20	25
C8	15	20	25
C9	8,5	11,0	13,5
C10	8,5	11,0	13,5
C11	8,5	11,0	13,5

Para evaluar la capacidad predictiva del modelo de calibración, se realizó un nuevo diseño experimental con dos niveles de concentración y un centro (2<sup>3</sup>+1). Para ello, se preparó un conjunto de validación conteniendo nueve mezclas sintéticas con un intervalo de concentraciones de: 2,5-10 mg L<sup>-1</sup> para SAC, 2,5-15 mg L<sup>-1</sup> para AC-K y 2,5-20 mg L<sup>-1</sup> para ASP (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2.** Composición de muestras sintéticas para el set de validación para SAC, AC-K y ASP ( $\text{mg L}^{-1}$ ), su concentración predicha por el modelo PLS-1 y el error relativo de predicción. La concentración de ASP se indica entre paréntesis

	CONCENTRACIÓN ( $\text{mg L}^{-1}$ )			
	SINTÉTICA		PREDICHA	
	SAC	AC-K	SAC	AC-K
T1 (2,5)	2,5	2,5	2,70	2,48
T2 (2,5)	10	2,5	9,52	2,55
T3 (2,5)	2,5	15	2,44	15,1
T4 (2,5)	10	15	9,82	14,8
T5 (20)	2,5	2,5	2,64	2,56
T6 (20)	10	2,5	10,4	2,64
T7 (20)	2,5	15	2,68	14,8
T8 (20)	10	15	9,80	14,9
T9 (10)	5	8	4,82	7,90
REP %			4,59	1,49

Para ambos conjuntos se prepararon las soluciones estándar de SAC, AC-K y ASP, luego se tomaron las cantidades correspondientes a cada una y se llevó a un volumen final de 10,0 mL con la solución reguladora Clark y Lubs de pH 1,3.

El registro de los espectros de las mezclas fue realizado al azar, desde 190 a 314 nm, en pasos de 2 nm. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Los espectros fueron transferidos al formato ASCII y se utilizó el programa MATLAB versión 6.0 con la subrutina MVC1 [20].

### 3.4.4. Figuras de mérito

La subrutina MVC1 [20] da los valores de las figuras de mérito: sensibilidad (SEN), selectividad (SEL) y límite de detección (LOD).

La SEN para un determinado analito  $k$  puede definirse como:

$$SEN_k = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|}$$

dónde  $\|\cdot\|$  indica la norma Eucladiana y  $\mathbf{b}_k$  es el vector de coeficientes de regresión apropiado para el componente  $k$ .

La SEL cuantifica la señal analítica que es superpuesta con las interferencias y es calculada como:

$$SEL_k = \frac{\|\mathbf{s}_k^*\|}{\|\mathbf{s}_k\|}$$

dónde  $\mathbf{s}_k$  es el vector de la sensibilidad espectral de componentes  $k$  en forma pura y  $\mathbf{s}_k^*$  es la proyección correspondiente.

Se define como LOD:

$$LOD = 3,3 \|\delta_r\| \|\mathbf{b}_k\|$$

dónde  $\delta_r$  es una medida del ruido instrumental.

### 3.4.5. Muestras reales

Las muestras utilizadas para la determinación de SAC y AC-K se adquirieron en un local comercial. Puesto que estas muestras contenían diferentes cantidades de ASP, se dividió al conjunto de muestras en dos grupos:

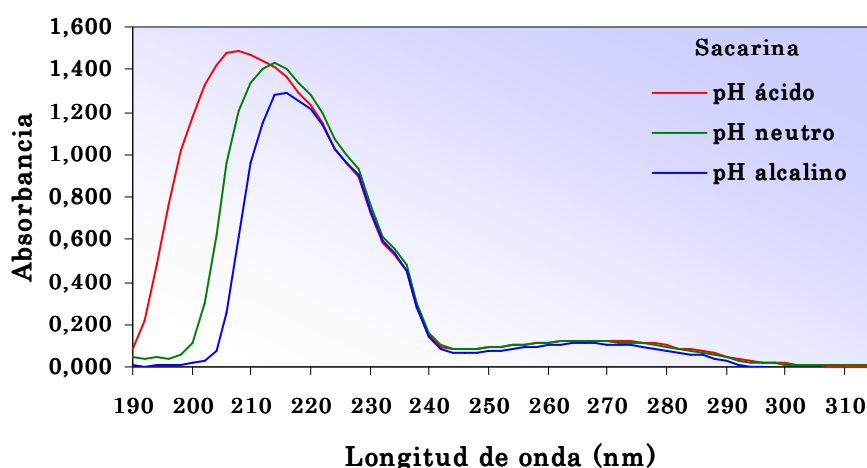
- *Muestras A:* compuestas por endulzantes (en polvo, líquidos y tabletas) con una concentración de ASP menor o igual que SAC y AC-K.
- *Muestras B:* constituidas por tres jugos de fruta en polvo con una concentración de ASP de aproximadamente 10 veces mayor que SAC y AC-K.

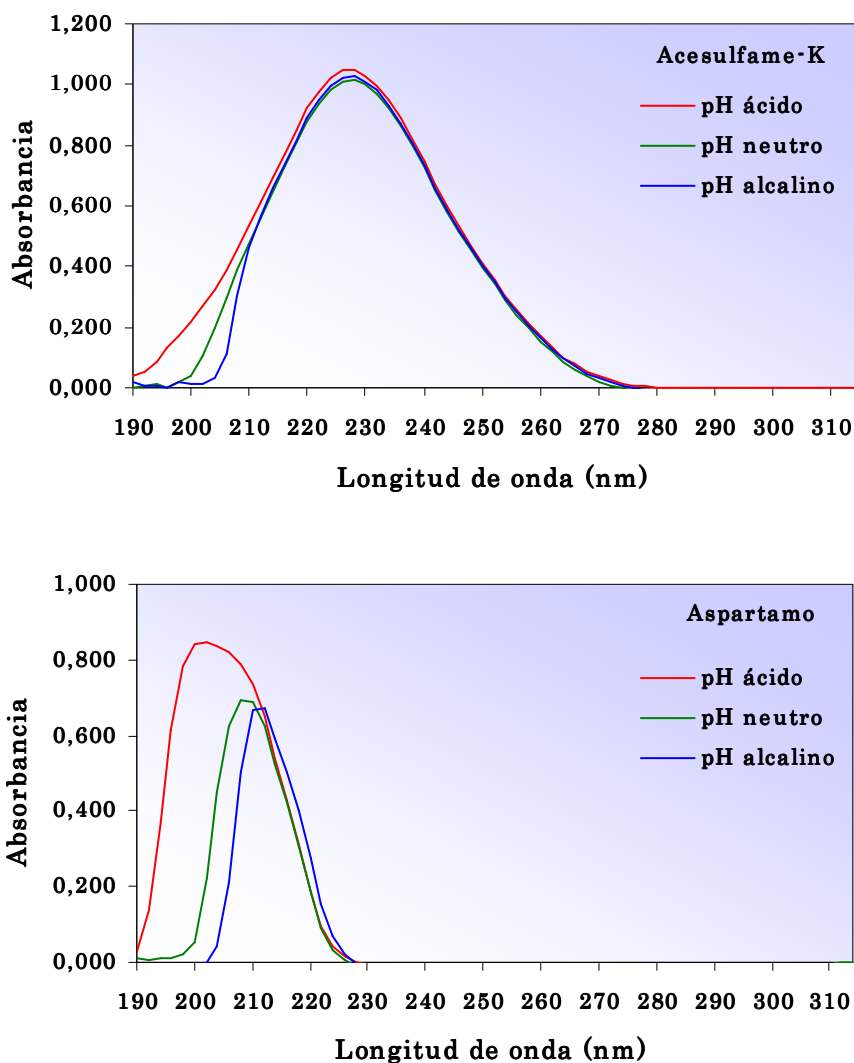
Las muestras se prepararon teniendo en cuenta el valor de los analitos declarados en el rótulo. Para ello se realizó una dilución de las mismas en agua y luego una posterior dilución con la solución reguladora Clark y Lubs (pH 1,3).

### 3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.5.1. Espectros de absorción de SAC, AC-K y ASP

Se realizó un exhaustivo estudio de la influencia del pH en los espectros de absorción UV de SAC, AC-K y ASP. Para llevar a cabo este análisis primeramente se registraron los espectros utilizando soluciones reguladoras Britton Robinson de pH 1,6; 2,0; 3,7; 4,2; 5,2; 6,4; 6,9; 8,6; 9,2; 10,5; 11,7; 12,3. En todos los casos se utilizaron soluciones de SAC, AC-K y ASP de concentración 20,0; 20,0 y 29,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En la **Figura 3.2** se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de absorción de SAC, AC-K y ASP a pH ácido, neutro y alcalino.

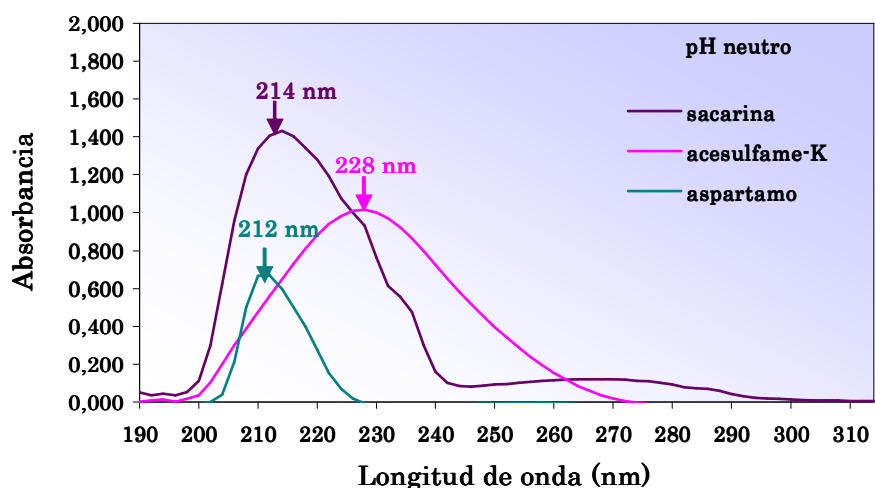
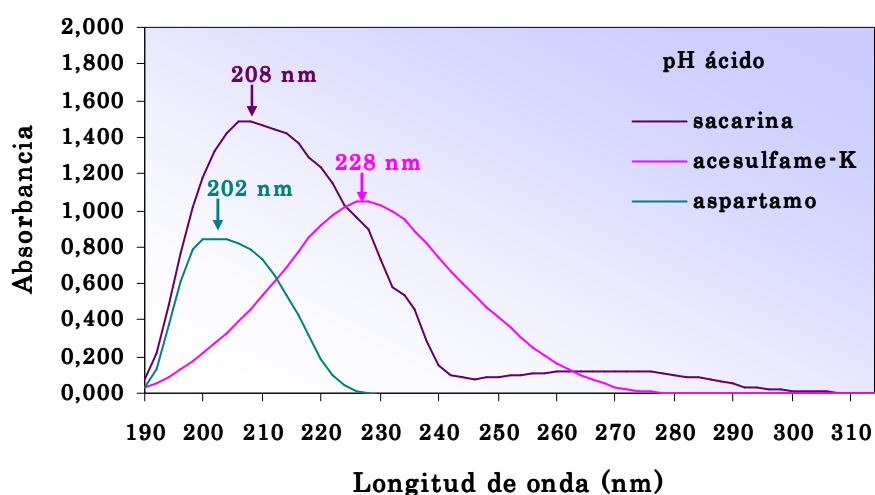


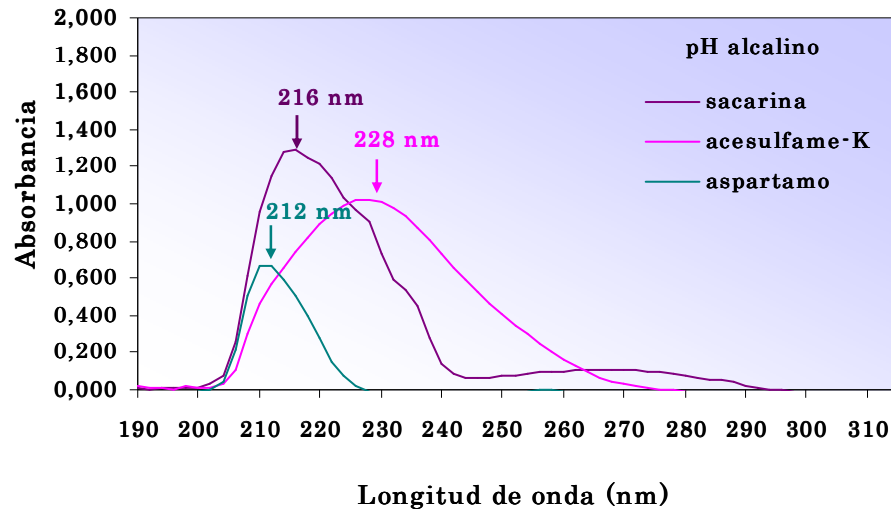


**Figura 3.2.** Espectros de absorción para sacarina, acesulfame-K y aspartamo a pH ácido, neutro y alcalino

Para la SAC se observa que, a medida que aumenta el pH, el máximo de absorción de la banda de mayor intensidad se desplaza hacia mayores longitudes de onda. Por otro lado, el AC-K exhibe espectros de absorción similares en todo el rango de pH estudiado, presentando un máximo de absorción a 228 nm. Finalmente, el ASP presenta una única banda de absorción cuyo máximo se desplaza hacia mayores longitudes de onda al aumentar el pH.

Con el fin de llevar a cabo el análisis quimiométrico y teniendo en cuenta el estudio realizado anteriormente, se procede a seleccionar el pH adecuado en donde las bandas de absorción de SAC, AC-K y ASP presentan la menor superposición. Por lo tanto se muestran, en la **Figura 3.3**, los espectros de SAC, AC-K y ASP a pH ácido, neutro y alcalino. Como se puede apreciar, a pH ácido se obtiene la menor superposición de los máximos de absorción para SAC (208 nm), AC-K (228 nm) y ASP (202 nm), por lo tanto resulta el apropiado.





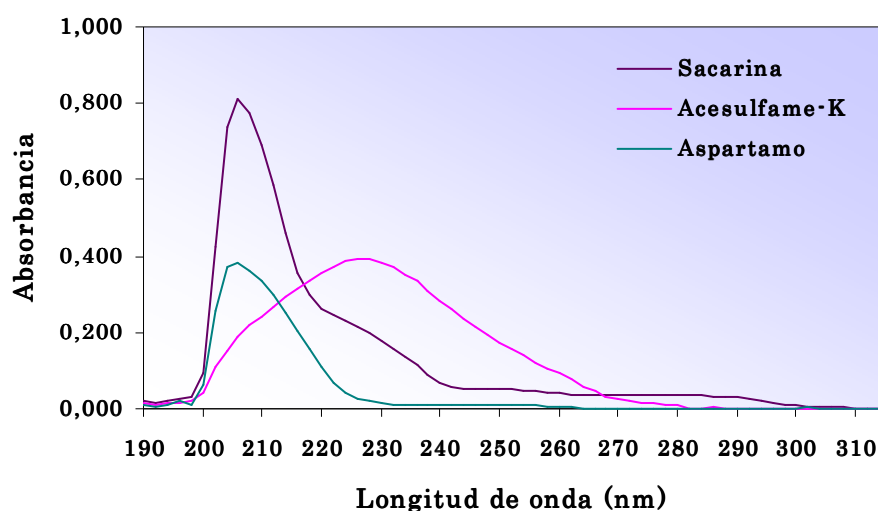
**Figura 3.3.** Espectros de absorción para sacarina, acesulfame-K y aspartamo, a pH ácido, neutro y alcalino

Finalmente, se completa el estudio realizado anteriormente, analizando la superposición de los espectros de SAC, AC-K y ASP con otras soluciones reguladoras de pH ácido: biftalato de potasio-ácido clorhídrico (pH 3,3), citrato de sodio-ácido clorhídrico (pH 3,3), ácido acético-acetato de sodio (pH entre 4,0 y 5,3) y Clark y Lubs (pH entre 1,2 y 2,2).

Se observó que la SAC no presenta absorción cuando se utilizan las soluciones reguladoras de biftalato de potasio-ácido clorhídrico y citrato de sodio-ácido clorhídrico. Utilizando la solución reguladora ácido acético-acetato de sodio, se observó un marcado solapamiento entre los espectros de absorción de SAC y AC-K, que presentan bandas de absorción con máximos en 230 y 232 nm, respectivamente.

Utilizando la solución reguladora Clark y Lubs en el rango de pH entre 1,2 y 2,2 no se observan diferencias significativas en los espectros de AC-K. Por otro lado, se notó que a pH 1,3 la banda de SAC presenta máximo de absorción a 206 nm y es más angosta que utilizando la solución reguladora Britton Robinson de pH ácido, lo que disminuye la

superposición entre las bandas de SAC y AC-K. Como se muestra en la **Figura 3.4.**, el AC-K presenta una banda menos intensa a 228 nm y el ASP exhibe una banda de absorción en la región comprendida entre 200-220 nm la que se encuentra solapada por la banda de SAC. De este estudio surge que la solución reguladora de trabajo Clark y Lubs de pH 1,3 es la óptima.



**Figura 3.4.** Espectros de absorción de SAC ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ), AC-K ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ASP ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) a pH 1,3

### 3.5.2. Modelos PLS para calibración y validación

En una primera etapa, para aplicar el modelo PLS-1, se realizó un diseño factorial completo  $2^2$ : dos factores (SAC y AC-K) y dos niveles de concentración, para el conjunto de calibración y validación. Los resultados de concentración de SAC y AC-K obtenidos en las muestras reales, aplicando este modelo no fueron satisfactorios. Esto podría deberse a que todas las muestras analizadas contenían ASP. Además como se observa en la **Figura 3.4.**, existe una gran la superposición espectral de SAC con este edulcorante. Por lo tanto se decidió incorporar al ASP dentro del modelo de calibración.



Para ello, se planteó un nuevo diseño factorial completo incluyendo SAC, AC-K y ASP. Se construye un conjunto de calibración ( $2^3+3$ ), es decir, dos niveles de concentración, para SAC, AC-K y ASP y tres centros.

Se realizaron dos modelos de calibración PLS-1 para SAC y AC-K. Para ambos modelos se seleccionó un intervalo de longitudes de onda de manera tal de conformar una matriz de dimensión 11x16 con los datos UV. El número de filas corresponde a los espectros de las mezclas en el diseño experimental, mientras que las columnas son las longitudes de onda entre 260 a 290 nm para SAC y desde 220 a 250 nm para AC-K, ambos registros en pasos de 2 nm. Los datos de concentración fueron construidos en una matriz de 11x1.

### **3.5.3. Parámetros estadísticos**

El análisis de datos espectrales se realizó empleando el algoritmo PLS, en el modo PLS-1. Para obtener información de la región espectral que provee los mejores resultados de predicción para SAC y AC-K, se utilizó la estrategia de selección de ventana móvil <sup>[21]</sup>. El número apropiado de factores para la calibración se llevó a cabo aplicando la técnica de validación cruzada <sup>[19]</sup>.

En la **Tabla 3.3**, se muestran, para SAC y AC-K la región espectral óptima seleccionada, el número de factores, el porcentaje de varianza capturada para cada bloque en el modelo PLS, el error relativo de predicción (REP %), la selectividad (SEL), la sensibilidad analítica (SEN) y el límite de detección (LOD).

**Tabla 3.3.** Región espectral, número de factores y parámetros estadísticos de la calibración para SAC y AC-K aplicando PLS-1

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	SAC	AC-K
Región espectral (nm)	260-290	220-250
Número óptimo de factores <sup>a</sup>	4	5
% varianza x / % varianza y	100/99,85	100/99,99
REP (%) <sup>b</sup>	5,80	1,53
SEN	0,12*10 <sup>-2</sup>	0,72*10 <sup>-2</sup>
SEL	4,91*10 <sup>-2</sup>	4,48*10 <sup>-2</sup>
LOD (mg L <sup>-1</sup> )	0,312	0,085

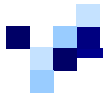
a= número óptimo de factores seleccionados según el criterio de Haaland <sup>[19]</sup>.

b= Error Relativo de la Predicción, REP (%)=  $100 / x [1/ n \Sigma (x_{pred} - x_{act})^2]^{1/2}$ , donde  $x$  es la concentración promedio en la  $n$  mezclas de calibración;  $n$  es el número total de mezclas utilizadas en el set de predicción;  $x_{pred}$  representa la concentración estimada del analito en la muestra;  $x_{act}$  es la concentración verdadera del analito en la muestra.

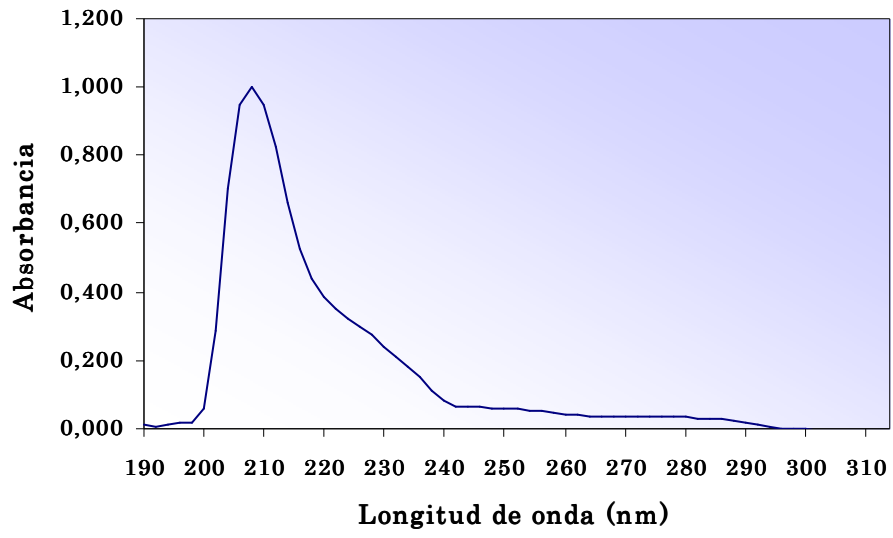
### 3.5.4. Análisis de muestras reales

El método propuesto se aplicó a la determinación simultánea de SAC y AC-K en las muestras descritas en la **sección 3.4.5**.

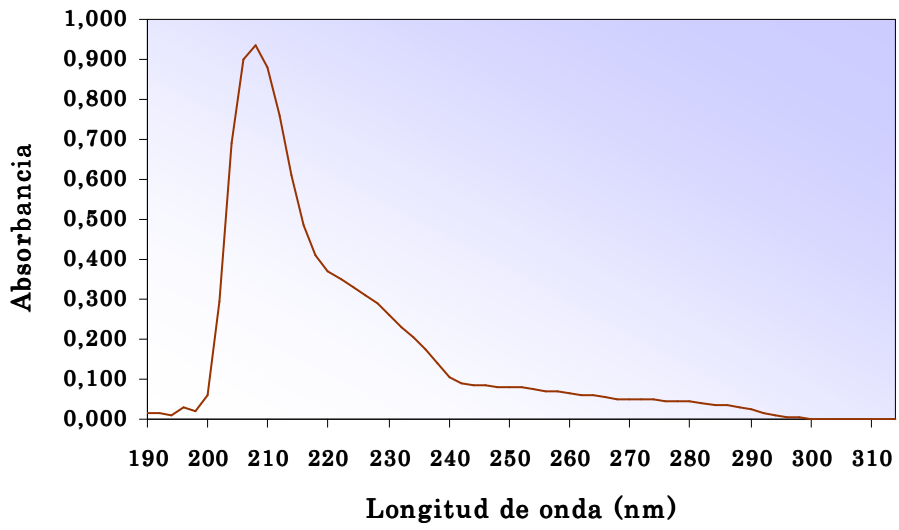
En la **Figura 3.5**, se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de absorción de tres de las muestras estudiadas. En la **Tabla 3.4**, se presentan las concentraciones de SAC y AC-K en las muestras obtenidas por el método propuesto y las concentraciones declaradas en el rótulo.



a.

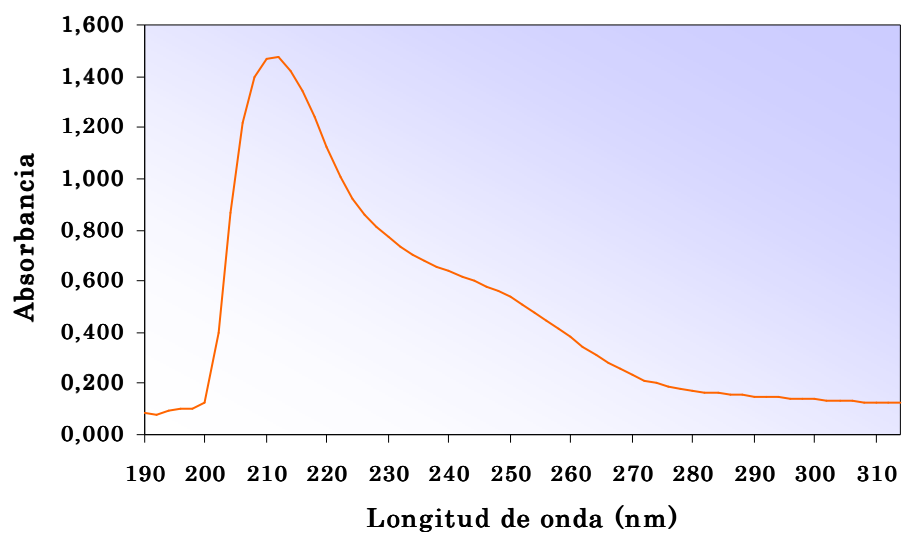


b.





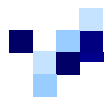
c.



**Figura 3.5.** Espectros de absorción de las muestras utilizadas: **a.** endulzante líquido, **b.** endulzante en polvo y en tableta, **c.** jugo en polvo

**Tabla 3.4.** Concentración de SAC y AC-K en las muestras reales analizadas. Unidades de concentración: a (g % m/v); b (mg/g); c (g % m/m); d (mg % m/v)

CONCENTRACIÓN			
MUESTRAS	ANALITO	VALOR OBTENIDO	VALOR ROTULADO
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	<b>2,80</b>	2,70
	AC-K	<b>0</b>	0
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	<b>2,80</b>	2,70
	AC-K	<b>3,35</b>	3,38
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	<b>2,82</b>	2,70
	AC-K	<b>0</b>	0
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	<b>2,80</b>	2,70
	AC-K	<b>3,42</b>	3,38
Endulzante en polvo <sup>b</sup>	SAC	<b>0</b>	0
	AC-K	<b>14,95</b>	14,05
Endulzante en polvo <sup>b</sup>	SAC	<b>11,26</b>	11,23
	AC-K	<b>12,60</b>	14,03
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	<b>8,47</b>	9,83
	AC-K	<b>0</b>	0
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	<b>8,72</b>	9,95
	AC-K	<b>12,30</b>	12,40
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	<b>8,54</b>	9,68
	AC-K	<b>0</b>	0
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	<b>8,41</b>	9,98
	AC-K	<b>12,67</b>	12,50
Jugo en polvo <sup>d</sup>	SAC	<b>0</b>	0
	AC-K	<b>3,01</b>	2,86
Jugo en polvo <sup>d</sup>	SAC	<b>0</b>	0
	AC-K	<b>2,53</b>	4,00
Jugo en polvo <sup>d</sup>	SAC	<b>5,12</b>	5,26
	AC-K	<b>4,01</b>	4,00



### 3.5.5. Estudio de recuperación

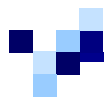
La Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) propone diferentes métodos para la determinación de sacarina según el tipo de muestra a analizar. Estos métodos requieren una serie de pasos laboriosos tales como filtración, extracción, separación, evaporación, etc., y además utilizan reactivos tóxicos (éter, cloruro de amonio, amoníaco, acetato de plomo, etc.) nocivos para la salud del analista y el medioambiente [22].

En cuanto a la determinación de acesulfame-K generalmente se emplea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [13, 15, 16].

La validación del método se llevó a cabo utilizando muestras enriquecidas y haciendo el estudio de recuperación. Con este propósito, a cada una de las muestras estudiadas se les adicionó una determinada concentración de SAC y AC-K, teniendo en cuenta lo especificado en el rótulo de cada envase. Los resultados del estudio de recuperación se muestran en la **Tabla 3.5**. Se observa que los porcentajes de recuperación obtenidos son altamente satisfactorios, los cuales estuvieron entre 92,6 a 108,8 % para SAC y 90,9 a 102,6 % para AC-K.

**Tabla 3.5.** Estudio de recuperación en las muestras reales. Unidades de concentración: a (g % m/v); b (mg/g); c (g % m/m); d (mg % m/v)

MUESTRAS	ANALITO	CONCENTRACIÓN		
		AGREGADA	OBTENIDA	% DE RECUPERACIÓN
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	1,35	4,17 ± 0,18	<b>101,5</b>
	AC-K	0	0	<b>0</b>
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	1,35	4,10 ± 0,08	<b>96,3</b>
	AC-K	4,73	7,83 ± 0,01	<b>94,7</b>
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	1,35	4,07 ± 0,01	<b>92,6</b>
	AC-K	0	0	<b>0</b>
Endulzante líquido <sup>a</sup>	SAC	1,35	4,06 ± 0,01	<b>93,3</b>
	AC-K	4,73	7,87 ± 0,05	<b>94,1</b>
Endulzante en polvo <sup>b</sup>	SAC	0	0	<b>0</b>
	AC-K	4,21	19,07 ± 0,08	<b>97,9</b>
Endulzante en polvo <sup>b</sup>	SAC	19,65	30,26 ± 0,50	<b>96,8</b>
	AC-K	6,02	18,35 ± 0,21	<b>95,5</b>
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	4,91	13,34 ± 0,01	<b>99,2</b>
	AC-K	0	0	<b>0</b>
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	4,98	13,67 ± 0,09	<b>99,4</b>
	AC-K	17,41	28,68 ± 0,03	<b>94,1</b>
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	2,42	10,87 ± 0,10	<b>96,3</b>
	AC-K	0	0	<b>0</b>
Endulzante en tableta <sup>c</sup>	SAC	4,99	13,57 ± 0,01	<b>103,4</b>
	AC-K	17,46	28,68 ± 0,19	<b>91,7</b>
Jugo en polvo <sup>d</sup>	SAC	0	0	<b>0</b>
	AC-K	8,68	11,92 ± 0,30	<b>102,6</b>
		14,89	17,45 ± 0,18	<b>96,7</b>
Jugo en polvo <sup>d</sup>	SAC	0	0	<b>0</b>
	AC-K	12,31	14,59 ± 0,15	<b>98,0</b>
		21,10	23,42 ± 0,10	<b>99,0</b>
Jugo en polvo <sup>d</sup>	SAC	5,26	10,14 ± 0,50	<b>95,4</b>
		7,01	12,76 ± 0,31	<b>108,8</b>
		8,77	14,49 ± 0,51	<b>106,8</b>
	AC-K	7,01	10,85 ± 0,12	<b>97,6</b>
		8,77	11,98 ± 0,12	<b>90,9</b>
		12,27	15,50 ± 0,43	<b>93,6</b>



### 3.5.6. Estudio de interferentes

Debido a que las muestras estudiadas presentan una matriz compleja, se realizó el análisis de los compuestos comúnmente encontrados en este tipo de muestras. En este estudio, no se encontraron interferencia de: ácido benzoico, hidratos de carbono (azúcar), lactosa, carboximetilcelulosa, almidón modificado, vitaminas A, E y C, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido ascórbico y fosfato tricálcico. El criterio que se adopta es considerar interferencias cuando el error relativo % en la señal es  $\geq 5\%$ .



### **3.6. CONCLUSIONES PARCIALES**

La aplicación conjunta de espectrometría UV acoplada a calibración multivariada (PLS-1) como herramienta quimiométrica permitió determinar sacarina y/o acesulfame-K en muestras de matrices complejas, como endulzantes comerciales (líquidos y sólidos) y jugos de fruta en polvo.

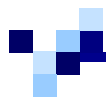
El pretratamiento de las muestras consiste en hacer una dilución y llevar a volumen con la disolución reguladora al pH apropiado.

El método propuesto puede ser considerado una alternativa rápida para el análisis de control de alimentos, con la utilización de instrumentos simples y de bajo costo.

La aplicabilidad del mismo se probó a través de un estudio de recuperación y los porcentajes de recuperación fueron altamente satisfactorios.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] B. Schulze, K. Illgen, *J. Prakt. Chem.*, 339, 1 (1997).
- [2] J.W. Ellis, *J. Chem. Educ.*, 72, 671 (1995).
- [3] I. Remsen, C. Fahlberg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 12, 469 (1879).
- [4] I. Remsen, C. Fahlberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1, 426 (1879/1880).
- [5] R. Mazur, Kirk–Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 22, pág. 448, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley, New York, (1983).
- [6] G. A. Iacobucci, *Ind. Quím.* 334, 18 (1998).
- [7] M. J. Price, G. C. Biava, L. B. Oser, E. E. Vogin, J. Steinfeld, L. H. Ley, *Science*, 167, 1131 (1970).
- [8] O. Fatibello-Filho, I. D. Vieira, S. T. Gouveia, S. A. Calafatti, A. J. M. Guaritá-Santos, *Química Nova*, 19, 248 (1996).
- [9] The European Parliament and The Council of The European Union, Directive 94/35/EC (30 June 1994) and Directive 96/83/EC (19 December 1996).
- [10] Q. C. Chen, J. Wang, *J. Chrom. A*, 937, 57 (2001).
- [11] Código Alimentario Argentino, Capítulo XVII, Artículo 1348 (actualizado al mes de julio de 2008)
- [12] J. Mercola, K. Pearsall, *Sweet Deception: Why Splenda, Nutrasweet and the FDA may be hazardous to your health*, Nashville, Tennessee, Thomas Nelson, Inc (2006).
- [13] D. Woods, US scientists challenge approval of sweeteners, *British Medical Journal* (BMJ), 313, 386 (1996).
- [14] European Food Safety Authority, [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)
- [15] A. Wasik, J. McCourt, M. Buchgraber, *J. Chrom. A*, 1157, 187 (2007).
- [16] Y. Zhua, Y. Guo, M. Ye, F. S. James, *J. Chrom. A*, 1085, 143 (2005).

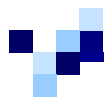


- [17] J. F. García-Jiménez, M. C. Valencia, L. F. Capitán-Vallvey, *Anal. Chim. Acta*, 594, 226 (2007).
- [18] H. Wold, *Perspectives in Probability and Statistics*, Academic Press, Londres (1975).
- [19] E. Tomas, D. Haaland, *Anal. Chem.*, 60, 1193 (1988).
- [20] A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 73, 189 (2004).
- [21] H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri, *Analyst* 124, 725 (1999).
- [22] *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, (Official Method 973.29, 934.04, 969.27), Arlington, USA.



## *Capítulo 4*

DETERMINACIÓN  
AUTOMÁTICA DE ÁCIDO  
ASCÓRBICO Y AZÚCARES  
TOTALES UTILIZANDO  
FOTODEGRADACIÓN EN LÍNEA



## 4.1. INTRODUCCIÓN

Los frutos cítricos tuvieron su origen hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático y hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones naturales u originadas por el hombre. Debido a los grandes movimientos migratorios como las conquistas de Alejandro Magno, expansión del Islam, descubrimiento de América, etc., los cítricos se dispersaron desde sus lugares de origen hacia todo el mundo.

Las frutas cítricas cuentan con más de 145 especies, entre las que se destacan: naranja, mandarina, limón, lima y toronja. Contienen carbohidratos, fibra, vitamina C, potasio, ácido fólico, calcio, tiamina, niacina, vitamina B6, fósforo, magnesio, cobre, riboflavina, ácido pantoténico, entre otros nutrientes.

Además, las frutas cítricas y sus jugos pueden contribuir a reducir el riesgo de contraer cáncer, enfermedades cardiovasculares, anemia, malformaciones congénitas y cataratas, y ayudan a compensar y prevenir la carencia de micronutrientes.

A pesar de todas las cualidades que presentan las frutas cítricas naturales, en la actualidad, por el ritmo de vida actual, la influencia de los medios de comunicación y la publicidad de ciertos productos de consumo, la población prefiere adquirir jugos de frutas cítricas comerciales.

El Código Alimentario Argentino incluye a los jugos de fruta comerciales dentro del grupo de Bebidas sin Alcohol o Bebidas Analcohólicas <sup>[1]</sup>.

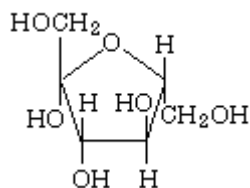
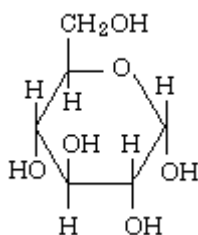
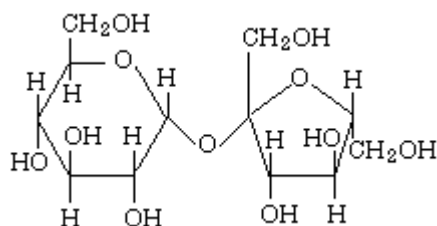
La Norma General del Codex Alimentarius de la FAO/OMS para zumos (jugos) y néctares de frutas establece que zumo (jugo) de fruta es *“el líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por*

*procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha de conformidad con las disposiciones pertinentes de la Comisión del Codex Alimentarius*<sup>[2]</sup>.

Los jugos de frutas presentan en su composición azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa, y ácido ascórbico <sup>[3]</sup>.

La sacarosa, también llamada azúcar común o azúcar de mesa, es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de fructosa, que se obtiene principalmente de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera (**Figura 4.1**). En la Argentina, como en casi toda Sudamérica, sólo se obtiene a partir de la caña de azúcar.

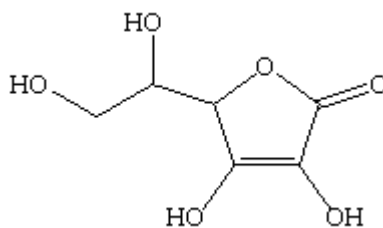
Si bien los azúcares se encuentran naturalmente en las frutas, son adicionados durante la elaboración de los jugos de fruta comerciales con la finalidad de mejorar su sabor. El Código Alimentario Argentino <sup>[1]</sup> establece que a los jugos de fruta se les podrá adicionar edulcorantes nutritivos: azúcar blanco o común (sacarosa), dextrosa, azúcar invertido (glucosa y fructosa), jarabe de glucosa o sus mezclas. Asimismo, el Codex <sup>[2]</sup> incluye a los azúcares como ingredientes autorizados para los jugos de fruta y establece que podrán añadirse azúcares (sacarosa, dextrosa anhidra, glucosa y fructosa) con menos del 2 % de humedad. Sin embargo la etiqueta de Propiedades Nutricionales no hace distinción entre azúcares naturales y azúcares agregados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que un excesivo consumo de alimentos que contengan azúcar añadido puede provocar caries dentales y obesidad. En general, recomienda que el consumo de azúcar añadido en diferentes alimentos no supere un nivel de entre un 6 y 10 % de la ingesta alimentaria total.

*a.**b.**c.*

**Figura 4.1.** Estructuras químicas: *a.* fructosa, *b.* glucosa, *c.* sacarosa

El ácido ascórbico (**Figura 4.2**) o Vitamina C es un poderoso antioxidante natural presente en numerosos alimentos, especialmente en frutas y vegetales que juega un rol importante en la prevención de enfermedades infecciosas. Debido a que el ácido ascórbico no es sintetizado por el organismo, debe ser ingerido con los alimentos que lo proporcionan.

En la industria alimentaria se utiliza el ácido ascórbico como antioxidante para prevenir cambios en el color, sabor y olor de los alimentos [4]. Este aditivo se oxida rápidamente y su contenido disminuye en frutas envasadas, productos deshidratados y jugos comerciales, por la exposición prolongada con el aire y la luz.



**Figura 4.2.** Estructura química del ácido ascórbico

El Codex <sup>[5]</sup> y el Código Alimentario Argentino <sup>[6]</sup> establecen que el ácido ascórbico puede ser utilizado como aditivo. Además, su agregado a los jugos de fruta comerciales se debe realizar según las Buenas Prácticas de Fabricación (B.P.F.), es decir “*sin limitaciones cuantitativas, siempre que cumpla las funciones determinadas y que estas funciones estén autorizadas en el alimento en cuestión*”. La Ingesta Diaria Admisible (IDA), no se encuentra especificada para el ácido ascórbico, es decir que su utilización podría estar permitida en todos los alimentos sin otra limitación que su conformidad con las B.P.F. No obstante una IDA no especificada no significa una ingestión ilimitada <sup>[7]</sup>. Además, el Código Alimentario Argentino <sup>[1]</sup> establece que cuando se adicione ácido ascórbico como antioxidante a jugos de fruta se hará sin declarar en el rótulo: “*Contiene Vitamina C*”.

El ácido ascórbico y los azúcares presentes en jugos de fruta pueden modificar las características químicas y sensoriales de los alimentos como pH, acidez total, dulzor, estabilidad microbiológica, etc. Además pueden proveer información acerca de la pureza del alimento y de cómo optimizar alguna etapa del proceso tecnológico <sup>[8]</sup>. La determinación de hidratos de carbono en jugos de fruta comerciales, permite evaluar la calidad de los alimentos y detectar una posible adulteración o contaminación de los mismos <sup>[9]</sup>. Por otro lado el control y la cuantificación de ácido ascórbico y de azúcares son de vital importancia para validar la autenticidad del producto y establecer posibles alteraciones microbiológicas producidas durante el almacenamiento <sup>[10]</sup>.





En la literatura se encuentran diferentes técnicas para la determinación de ácido ascórbico y azúcares en muestras de alimentos.

El contenido de ácido ascórbico en frutas y jugos de fruta se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) <sup>[11]</sup>, cromatografía gaseosa (GC) <sup>[12]</sup> y electroforesis <sup>[13]</sup>, ambas con detección UV y técnicas electroquímicas empleando un electrodo de carbono vítreo modificado <sup>[4]</sup>.

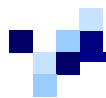
Por otro lado, Liu y col. <sup>[14]</sup> determinaron ácido ascórbico utilizando su efecto catalizador en la formación del complejo de cobre con porfirina. Para ello emplearon la metodología de análisis por inyección en flujo con detección UV-V.

Un procedimiento en flujo de un sistema multibomba con detección quimioluminiscente se utilizó para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta en polvo. El método se basó en la inhibición que provoca el ácido ascórbico en la oxidación del luminol por peróxido de hidrógeno en medio alcalino <sup>[15]</sup>.

La Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) para la determinación de ácido ascórbico en jugos, propone una titulación con 2,6-dicloroindofenol <sup>[16]</sup>. Para ello se adiciona a la muestra una solución extractante de ácido metafosfórico-ácido acético. La muestra en medio ácido es filtrada y una alícuota del filtrado se titula con el indicador. El 2,6-dicloroindofenol es nocivo e irritante y ligeramente inflamable.

En cuanto al contenido de azúcares en bebidas y jugos de fruta se utiliza cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de la luz dispersada <sup>[9]</sup>, cromatografía gaseosa con espectrometría de masa <sup>[17]</sup> y electroforesis capilar con detección indirecta UV <sup>[18]</sup>.

Dentro de las técnicas electroquímicas, Maestre y col. <sup>[19]</sup> proponen una celda electroquímica en flujo para la determinación de carbohidratos empleando detección



bioelectrocatalítica. El método se aplicó a muestras de jugos y derivados de la leche. La determinación de glucosa y fructosa en frutas se llevó a cabo empleando la metodología de análisis por inyección en flujo con detección amperométrica de pulso<sup>[20]</sup>.

Roig y col.<sup>[21]</sup> realizaron una estimación del contenido de azúcares totales en bebidas y jugos. La determinación se basó en la detección UV de los productos de fotodegradación de los azúcares.

Por otro lado existen trabajos que proponen la determinación simultánea de azúcares y ácidos orgánicos. Chinnici y col.<sup>[8]</sup> emplean cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sin embargo, no pudieron determinar ácido ascórbico debido a su degradación dentro de la columna. Azúcares y ácidos orgánicos en cerezas se determinó utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)<sup>[22]</sup>. Por otro lado, Dong y col.<sup>[10]</sup> determinan ácido ascórbico y azúcares utilizando electroforesis capilar de zona con detección amperométrica empleando un electrodo de carbón modificado.



## 4.2. OBJETIVO

En este trabajo se propone un método analítico automático para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales utilizando la metodología de análisis por inyección en flujo (FIA) con un paso de fotodegradación en línea. El método se aplicó a jugos de fruta comerciales y naturales, de naranja y pomelo.

## 4.3. FUNDAMENTO

En la actualidad las reacciones fotoquímicas son un importante campo de investigación para la determinación de analitos fotorreactivos. Para determinaciones analíticas el fotón es un reactivo apropiado ya que es de bajo costo, simple de utilizar y no hay exceso de reactivo en el momento de la detección. La cantidad de radiación empleada depende del tiempo de irradiación, y la selectividad puede ser mejorada variando la potencia y la longitud de onda de la lámpara [23].

En los procesos de fotodegradación se usan lámparas de arco de mercurio de baja presión, con diferentes potencias de radiación (6 a 40 W), que dan prácticamente un espectro de línea simple (254 y 365 nm) como son las lámparas germicidas. También se pueden utilizar las llamadas “lámparas fluorescentes de luz negra” que en sus paredes internas están cubiertas de una sustancia fluorescente que actúa absorbiendo la radiación de 254 nm y deja pasar la de 365 nm.

La derivatización por fotodegradación de una especie química en solución puede llevarse a cabo en estático (batch) o en línea. La fotodegradación en estático presenta



ciertos inconvenientes operativos, fundamentalmente en relación al control estricto del tiempo de exposición que se requiere cuando se desea aplicar este tipo de tratamiento en un análisis cuantitativo. Esto se resuelve fácilmente si se trabaja en línea. La incorporación de una fuente de radiación a este tipo de sistemas resulta sumamente sencilla. La fotodegradación se puede llevar a cabo en un reactor (fotorreactor) que se arma enrollando un tubo de teflón, de longitud adecuada, en una lámpara.

Como ventajas de este tipo de sistemas se pueden destacar:

- ✓ El sistema está cubierto de manera que el analito solo recibirá luz de la fuente de radiación durante el tiempo necesario (perfectamente medible).
- ✓ Si se requieren medios de fotodegradación y de detección diferentes, la mezcla con los reactivos para proporcionar dichos medios se logra de manera sencilla y es reproducible.
- ✓ Los tiempos de fotodegradación se pueden controlar en forma reproducible. Esto se logra a través de cambios en la longitud de los fotorreactores, cambios en la velocidad de flujo de los reactivos ó haciendo uso de la modalidad de flujo detenido (deteniendo el flujo durante un tiempo perfectamente medido).
- ✓ Es posible combinarlo con diferentes detectores: espectrometría de absorción molecular, fluorescencia, quimioluminiscencia, electroanalíticos, etc.
- ✓ El cambio de fuente de radiación (longitudes de onda que proporciona) equivale a un cambio en la naturaleza del “reactivo derivatizante” (energía del fotón), dando así la posibilidad de mejorar la selectividad.
- ✓ Desde el punto de vista práctico y en vista de su aplicación analítica, no resulta imprescindible conocer la cinética de reacción dada la reproducibilidad que se logra en el control del tiempo en un sistema en continuo.

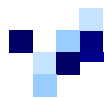


En este trabajo de Tesis se emplea la derivatización por fotodegradación para estimar la concentración de ácido ascórbico y azúcares totales. Los azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa son moléculas que no presentan absorción en la región UV mientras que el ácido ascórbico exhibe bandas de absorción en la zona UV del espectro electromagnético. Bajo determinadas condiciones experimentales, estos compuestos sufren cambios en su estructura química cuando son expuestos a una fuente de radiación UV de una determinada longitud de onda y potencia, en función del tiempo:

- ✓ Los azúcares, a pH alcalino, al ser irradiados con luz UV, sufren una oxidación transformándose en grupos carbonilos y presentan una absorción a 268 nm <sup>[21]</sup>.
- ✓ El ácido ascórbico presenta una banda de absorción a 300 nm a pH alcalino, la cual desaparece cuando es sometido a radiación UV, durante un tiempo determinado.

Estas características se utilizaron para determinar el contenido de ácido ascórbico a 300 nm antes del paso de fotodegradación y el contenido de azúcares totales a 268 nm, luego de exponer a la muestra a la radiación UV.

Para ello se diseñó un sistema FIA que tiene incorporado una lámpara de mercurio a baja presión para producir la fotodegradación de los analitos. De esta forma se logra combinar *metodología FIA/fotodegradación en línea/detección UV*.



## 4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

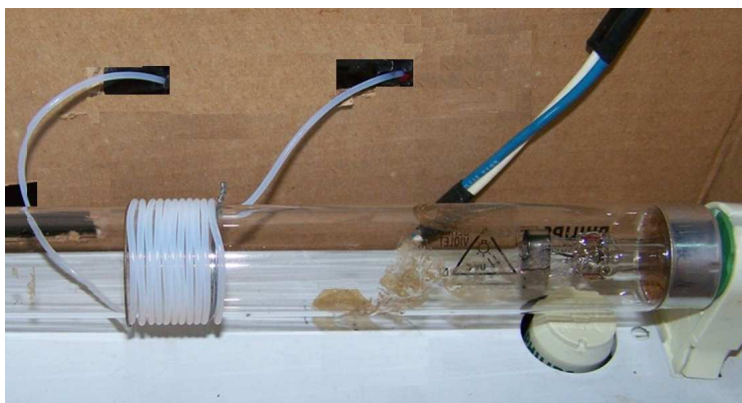
### 4.4.1. *Reactivos y soluciones*

Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con drogas y reactivos de calidad analítica y con agua ultra pura (18mΩ) empleando un sistema de purificación de agua B-pure.

- Solución patrón de ácido ascórbico 100 mg L<sup>-1</sup>: se preparó diariamente, disolviendo la cantidad apropiada de ácido ascórbico (Aldrich) y llevando a volumen con agua. Posteriormente se la protege de la luz, guardándola en un frasco color caramelo.
- Solución patrón de fructosa 50 g L<sup>-1</sup>: se pesó 2,500 g de fructosa (Anedra) y se llevó a 50,0 mL con agua.
- Soluciones de NaOH 0,05; 0,1 y 0,2 M: se prepararon disolviendo 2,0; 4,0 y 8,0 g de NaOH (Anedra), respectivamente y se llevaron a 1000,0 mL con agua.
- Solución de HCl 3,0\*10<sup>-3</sup> M (pH 2,5): se preparó diluyendo 248 μL de HCl (Merck, 37 %, δ= 1,19 g mL<sup>-1</sup>) y llevando a 1000,0 mL con agua.
- Solución reguladora Britton Robinson de pH 6,5: se preparó mezclando 37 mL de solución Britton Robinsón ácida (ácido acético (Mallinckrodt), ácido fosfórico (Tejon) y ácido bórico (Sigma) todas de concentración 0,04 M) con 15 mL NaOH 0,2 M (Cicarelli).

#### 4.4.2. Instrumentación

- ☑ Espectrofotómetro UV-V Hewlett Packard 8452A con arreglo lineal de diodos.
- ☑ Celda de flujo Hellma 178-010-QS con volumen interno de 18  $\mu\text{L}$  y 10 mm de paso óptico.
- ☑ Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3.
- ☑ Válvula de inyección Rheodyne 5041.
- ☑ Reactores de PoliTetraFlourEtileno (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno.
- ☑ Un electrodo de vidrio Ross Sure Flow 8172, conectado al pHmetro Orion research model 701A/digital ionalyzer, fue utilizado para realizar medidas potenciométricas de pH.
- ☑ El fotorreactor (**Figura 4.3.**) fue construido con tubos de PoliTetraFlourEtileno (PTFE) (0,8 mm de diámetro interno y longitud de 120 cm) enrollado alrededor de una lámpara UV de mercurio a baja presión y 15 watt (Philips). Esta es una típica lámpara germicida la cual emite una línea con un máximo en 254 nm. El fotorreactor se encuentra ensamblado dentro de una caja cuyas paredes internas fueron recubiertas con papel de aluminio, para aumentar el flujo del fotón por reflexión.



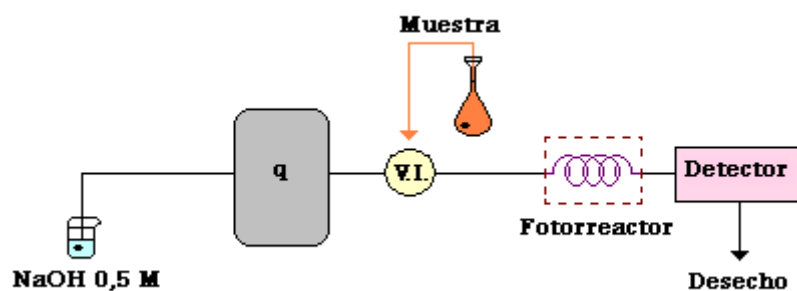
**Figura 4.3.** Foto del fotorreactor



### 4.4.3. Procedimiento

Se estudiaron diferentes configuraciones para el sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). En la **Figura 4.4.** se muestra el sistema seleccionado.

En primer lugar se procede a la determinación de ácido ascórbico. Para ello se enciende la B.P., que permite el ingreso de la solución de hidróxido de sodio. Luego, en la misma corriente de solución portadora se inyecta la muestra por medio de una válvula de inyección. Como se dijo anteriormente, el sistema tiene incorporado en línea el fotorreactor, por lo tanto cuando la lámpara se encuentra apagada se detecta la señal del ácido ascórbico a 300 nm. Posteriormente, para la determinación de los azúcares totales, se inyecta un nuevo volumen de muestra y cuando éste llega al fotorreactor, se detiene la B.P. y se enciende la lámpara durante 5 minutos. Luego, se restaura nuevamente el flujo y los azúcares totales son detectados a 268 nm. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.



**Figura 4.4.** Sistema FIA para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales:

B.P.: bomba peristáltica; V.I.: válvula de inyección; q: caudal





#### 4.4.4. Muestras reales

Para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales se utilizaron jugos de fruta comerciales de naranja y pomelo. La composición de las mismas se muestra en la

*Tabla 4.1:*

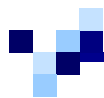
*Tabla 4.1. Composición de las muestras estudiadas*

MUESTRAS	INGREDIENTES
Jugo de fruta comercial de naranja (JFC 1)	60 % jugo de naranja, agua, azúcares, ácido ascórbico, aromatizantes
Jugo de fruta comercial de pomelo (JFC 2)	60 % jugo de pomelo, agua, azúcares, ácido ascórbico, aromatizantes
Jugo de fruta comercial de naranja (JFC 3)	50 % jugo de naranja, agua, jarabe de maíz de alta fructosa, azúcar, ácido ascórbico, aromatizantes
Jugo de fruta comercial de pomelo (JFC 4)	50 % jugo de pomelo, agua, jarabe de maíz de alta fructosa, azúcar, ácido ascórbico, aromatizantes

Además se analizaron jugos de fruta naturales de naranja y pomelo. Tanto las muestras comerciales como las naturales tienen un alto contenido de azúcares. Por otro lado, de acuerdo con las especificaciones del rótulo, las muestras comerciales no aportan cantidades significativas de fibra alimentaria. La piel y la pulpa de las frutas cítricas concentran la mayor parte de la fibra. Sin embargo, en la elaboración de jugos de fruta, la pulpa queda retenida durante el filtrado y se obtiene una bebida prácticamente sin fibra alimentaria.

Los jugos de fruta comerciales fueron homogeneizados y filtrados por medio de un filtro de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro. Los jugos de fruta natural fueron exprimidos y filtrados de la misma manera para remover la pulpa.

Para obtener una solución de muestra que contenga aproximadamente 10,0 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido ascórbico se tomó un volumen conveniente de jugos comerciales y naturales,



previamente filtrados, y se lo diluyó con agua (Solución A). Luego la solución A se diluyó para obtener una concentración de azúcares totales de aproximadamente  $0,20 \text{ g L}^{-1}$ .

## 4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.5.1. *Comportamiento del ácido ascórbico y los azúcares totales frente a la radiación UV*

Los azúcares que usualmente están presentes en los jugos naturales y comerciales son glucosa, sacarosa y fructosa [3].

Dichos azúcares como así también la lactosa, no absorben radiación en el UV. Roig y col. [20] determinaron que los azúcares son rápidamente oxidados cuando se los irradia con luz UV y que los productos de fotodegradación presentan un máximo de absorción a 268 nm. Estos compuestos fueron identificados como compuestos carbonílicos a través de una reacción colorimétrica con dinitrofenilhidrazina [24]. En el estudio realizado por Roig se establece que cuando azúcares tales como sacarosa, glucosa, fructosa y lactosa, son sometidos a radiación UV durante un cierto tiempo, las correspondientes curvas de calibrado obtenidas a 268 nm, presentan pendientes prácticamente iguales. Por consiguiente se puede utilizar cualquiera de esos azúcares para la determinación de azúcares totales. En esta Tesis, se seleccionó la fructosa para llevar a cabo la determinación.

El mecanismo de fotodegradación y los productos obtenidos dependen especialmente del medio y del tiempo de irradiación. Ambas variables fueron seleccionadas para determinar la mejor sensibilidad y reproducibilidad, para la señal de la fructosa a 268 nm y la disminución de la señal del ácido ascórbico después del paso de fotodegradación.

Para este propósito, se utilizaron dos soluciones estándar: una de ácido ascórbico de 12,5 mg L<sup>-1</sup> y otra de 0,352 g L<sup>-1</sup> de fructosa.

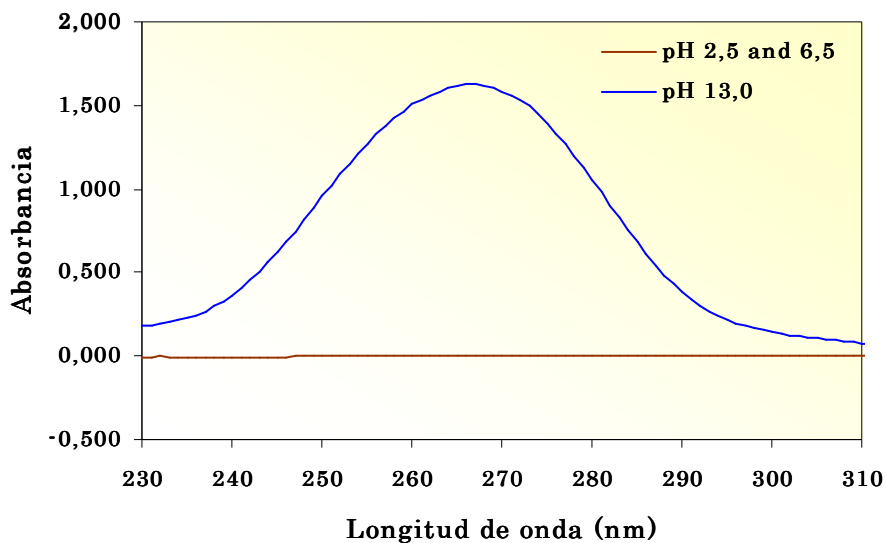
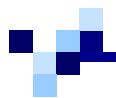
#### *I- Efecto del pH*

El paso de fotodegradación fue llevado a cabo en NaOH 0,05; 0,1 y 0,2 M, solución reguladora Britton Robinson (pH 6,5) y HCl 3,0\*10<sup>-3</sup> M (pH 2,5).

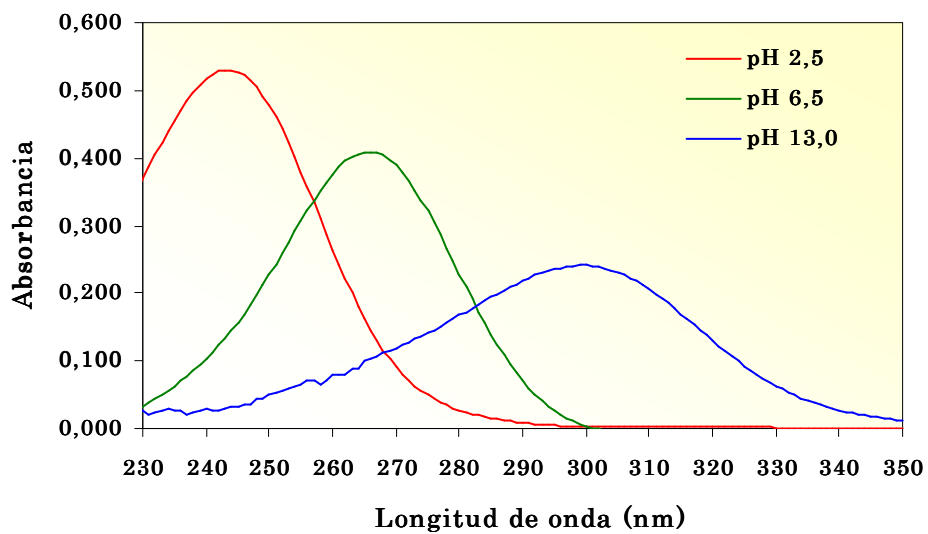
En la **Figura 4.5**. se muestra que, para la misma concentración de solución de fructosa y con un tiempo de radiación de 5 min, no se observa señal a 268 nm a pH ácido y neutro. Sin embargo, a pH alcalino aparece una banda bien definida y la mayor señal se obtiene con NaOH 0,1 M.

El comportamiento del ácido ascórbico a distintos pH se muestra en la **Figura 4.6**. Se observan tres bandas definidas para pH 2,5; 6,5 y 13,0.

De este estudio surge que se debe trabajar con NaOH 0,1 M ya que se obtiene una banda de absorción del ácido ascórbico a 300 nm y fundamentalmente porque aparece una banda de fructosa a 268 nm luego del paso de fotodegradación.



*Figura 4.5. Espectros de absorción de la fructosa a diferentes pH luego de 5 min de exposición a la radiación UV*



*Figura 4.6. Espectros de absorción del ácido ascórbico a diferentes pH*

*II- Influencia del tiempo de irradiación*

Se estudió el efecto del tiempo de irradiación sobre el ácido ascórbico y la fructosa en un rango desde 0 a 5 min. Como se observa en la **Figura 4.7.**, antes del paso de fotodegradación, el ácido ascórbico muestra una banda de absorción a 300 nm mientras que los azúcares no presentan bandas de absorción.

Por otro lado, cuando la fructosa es expuesta a radiación UV, aparece una banda de absorción con un máximo en 268 nm debido a los productos de fotodegradación de la fructosa. En la **Figura 4.8.** se aprecia que, un aumento en el tiempo de fotodegradación, origina una mayor señal de absorbancia de la fructosa a 268 nm y una disminución de la señal del ácido ascórbico a 300 nm.

En la **Figura 4.9.** se muestra el efecto de la radiación UV sobre el ácido ascórbico y la fructosa cuando son expuestos a la radiación UV durante 5 min. A este tiempo, la señal del ácido ascórbico desaparece y la intensidad de la banda de absorción de la fructosa es elevada.

Por lo tanto, el ácido ascórbico se determinó antes del paso de fotodegradación (tiempo de irradiación: 0 min) y la cuantificación de la fructosa después de 5 min de exposición a la luz UV.

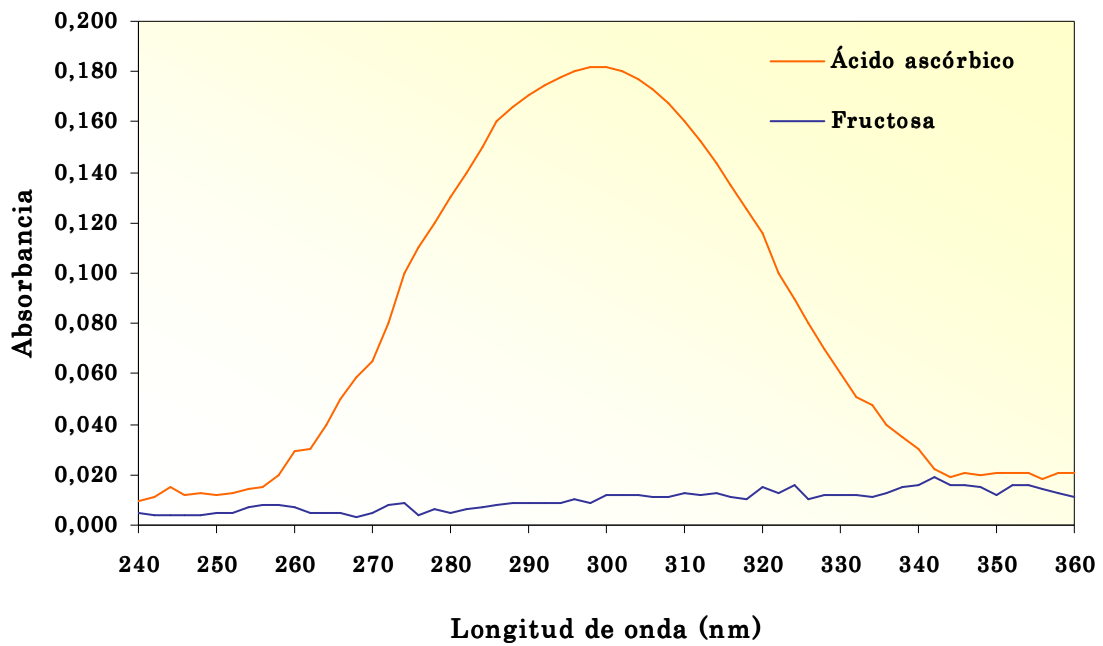
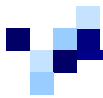


Figura 4.7. Espectros de absorción del ácido ascórbico y la fructosa antes del paso de fotodegradación

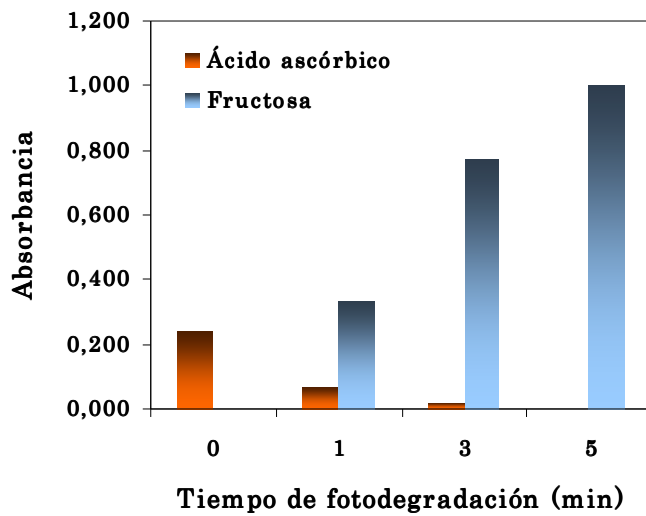
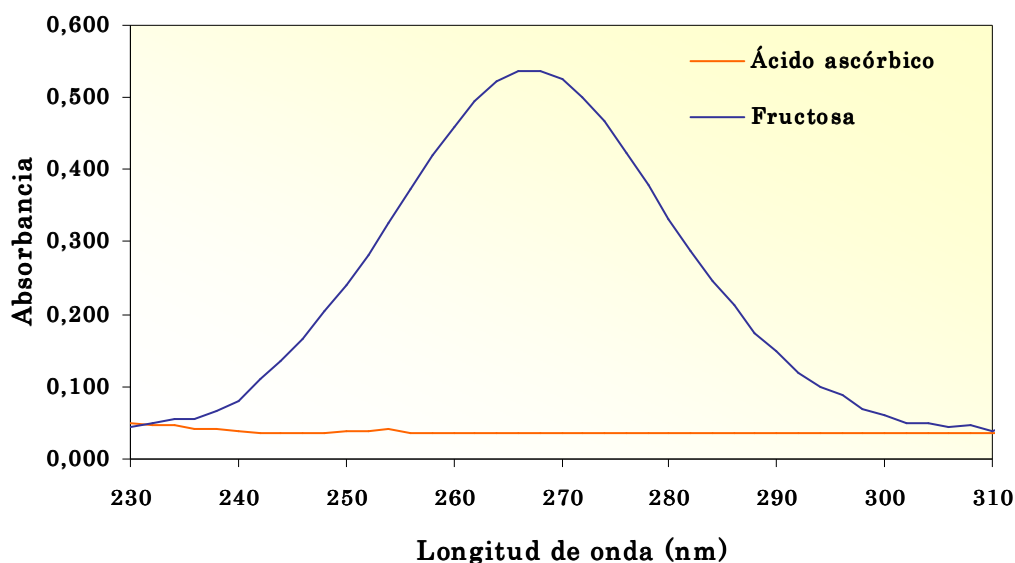


Figura 4.8. Efecto del tiempo de irradiación en el ácido ascórbico y la fructosa



**Figura 4.9.** Espectros de absorción del ácido ascórbico y fructosa luego de 5 min de degradación con luz UV

#### 4.5.2. Influencia de las Variables FIA

El volumen de muestra inyectado y la velocidad de flujo se optimizaron utilizando el método univariante, de manera tal de alcanzar un compromiso entre sensibilidad, frecuencia de muestreo y reproducibilidad de la señal FIA. En la **Tabla 4.2.** se observa el intervalo estudiado para cada variable y el valor óptimo obtenido.

**Tabla 4.2.** Optimización de las variables FIA del sistema propuesto

VARIABLE	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Volumen de muestra ( $\mu\text{L}$ )	30 – 100	<b>50</b>
q (Caudal portador) ( $\text{mL min}^{-1}$ )	1,0 - 3,5	<b>1,5</b>



### 4.5.3. Parámetros analíticos

Con el sistema FIA optimizado y una vez fijadas las condiciones experimentales, se realizan las curvas de calibrado para cada analito. El rango lineal de concentraciones está comprendido entre 4,18-20,80 mg L<sup>-1</sup> para el ácido ascórbico y entre 0,05-0,50 g fructosa L<sup>-1</sup> para azúcares totales.

Las curvas de calibrado obtenidas son:

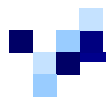
- ✓ Ácido ascórbico,  $A = (0,0146 \pm 0,0007) C + (0,0439 \pm 0,0086)$ ,  $R^2 = 0,9914$
- ✓ Azúcares totales,  $A = (2,391 \pm 0,048) C - (0,010 \pm 0,002)$ ,  $R^2 = 0,9984$ ,

siendo A la señal de absorbancia y C la concentración en mg L<sup>-1</sup> para el ácido ascórbico y en g fructosa L<sup>-1</sup> para azúcares totales (**Figuras 4.10. a. y b.**).

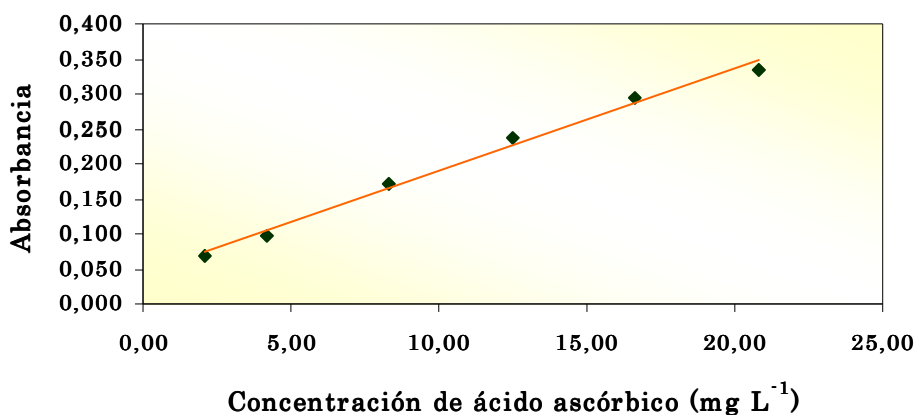
El límite de detección estimado (LOD) para una relación señal/ruido igual a 3 <sup>[25]</sup> fue de 2,26 mg L<sup>-1</sup> para el ácido ascórbico y 0,02 g L<sup>-1</sup> para azúcares totales. El límite de cuantificación para una relación señal/ruido igual a 10 (LOQ) <sup>[25]</sup> fue de 7,5 mg L<sup>-1</sup> para el ácido ascórbico y 0,09 g L<sup>-1</sup> para azúcares totales. La frecuencia de muestreo para el ácido ascórbico y fructosa fueron de 257 h<sup>-1</sup> y 12 h<sup>-1</sup> respectivamente.

La reproducibilidad del método, expresada como porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD %) para el ácido ascórbico (n = 11; 10,0 mg L<sup>-1</sup>) fue de 3,4 % y para los azúcares totales (n=11; 0,25 g L<sup>-1</sup>) fue de 2,8 %.





a.



b.

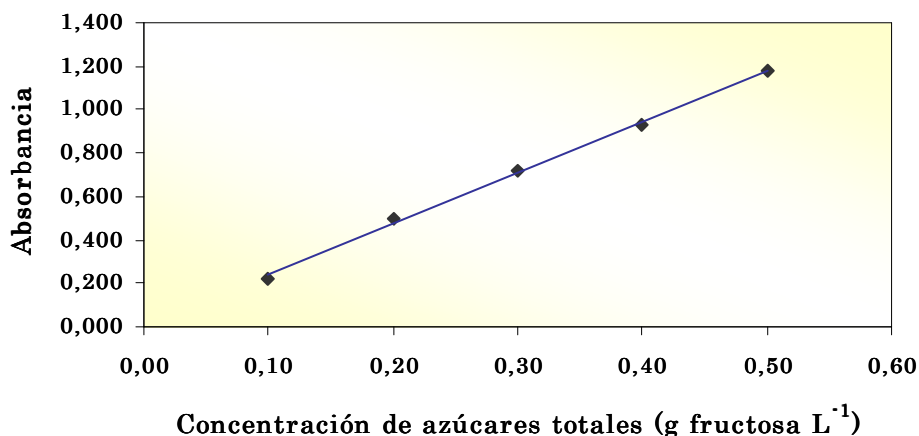


Figura 4.10. Curvas de calibrado: a. ácido ascórbico y b. azúcares totales

#### 4.5.4. Análisis de muestras reales

El método propuesto para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales fue aplicado a cuatro jugos de fruta comerciales y dos jugos de fruta naturales. En la **Tabla 4.3.** se presentan las concentraciones de ácido ascórbico y azúcares totales en las



muestras, obtenidas por el método propuesto, y las concentraciones declaradas en el rótulo.

**Tabla 4.3.** Concentración de ácido ascórbico (A.A.) y azúcares totales (A.T.) en las muestras reales analizadas. Unidades de concentración: g L<sup>-1</sup>

CONCENTRACIÓN			
MUESTRAS	ANALITO	VALOR OBTENIDO	VALOR ROTULADO
JFC 1	A.A.	<b>0,733</b>	No declarado
	A.T.	<b>126,6</b>	135,0
JFC 2	A.A.	<b>0,651</b>	No declarado
	A.T.	<b>132,0</b>	120,0
JFC 3	A.A.	<b>0,579</b>	No declarado
	A.T.	<b>111,3</b>	115,0
JFC 4	A.A.	<b>0,488</b>	No declarado
	A.T.	<b>128,5</b>	120,0
JNN	A.A.	<b>0,678</b>	0,28 – 0,86 <sup>[26]</sup>
	A.T.	<b>98,4</b>	60 – 110 <sup>[26]</sup>
JPN	A.A.	<b>0,432</b>	0,25 – 0,50 <sup>[26]</sup>
	A.T.	<b>81,9</b>	50 – 83 <sup>[26]</sup>

JFC 1: jugo de fruta comercial con 60 % de jugo de naranja

JFC 2: jugo de fruta comercial con 60 % de jugo de pomelo

JFC 3: jugo de fruta comercial con 50 % de jugo de naranja

JFC 4: jugo de fruta comercial con 50 % de jugo de pomelo

JNN: jugo de naranja natural

JPN: jugo de pomelo natural

#### 4.5.5. Validación del método propuesto

Para validar el método propuesto se realiza un estudio de recuperación. Para ello, se mide un determinado volumen de cada una de las muestras estudiadas y se adiciona una concentración conocida de ácido ascórbico y fructosa.



En la **Tabla 4.4.** se muestra la concentración de ambos analitos en las muestras, las concentraciones de ácido ascórbico y fructosa agregada para cada una de ellas y los resultados obtenidos. Los porcentajes de recuperación fueron aceptables para estos productos.

**Tabla 4.4.** Estudio de recuperación de ácido ascórbico (A.A.) y azúcares totales (A.T.) en las muestras reales. Unidades de concentración:  $g L^{-1}$

MUESTRAS	ANALITO	CONCENTRACIÓN		% DE RECUPERACIÓN
		AGREGADA	OBTENIDA	
JFC 1	A.A.	0,168	$0,908 \pm 0,003$	<b>104,2</b>
	A.T.	50,0	$175,7 \pm 2,1$	<b>98,2</b>
JFC 2	A.A.	0,168	$0,827 \pm 0,005$	<b>104,8</b>
	A.T.	50,0	$177,5 \pm 2,0$	<b>91,0</b>
JFC 3	A.A.	0,168	$0,761 \pm 0,02$	<b>108,3</b>
	A.T.	50,0	$159,5 \pm 2,2$	<b>96,3</b>
JFC 4	A.A.	0,168	$0,650 \pm 0,009$	<b>96,4</b>
	A.T.	50,0	$181,9 \pm 4,7$	<b>106,8</b>
JNN	A.A.	0,180	$0,861 \pm 0,02$	<b>101,7</b>
	A.T.	50,0	$155,0 \pm 1,4$	<b>113,2</b>
JPN	A.A.	0,180	$0,608 \pm 0,05$	<b>97,8</b>
	A.T.	50,0	$130,7 \pm 2,0$	<b>97,6</b>

JFC 1: jugo de fruta comercial con 60 % de jugo de naranja

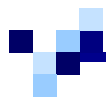
JFC 2: jugo de fruta comercial con 60 % de jugo de pomelo

JFC 3: jugo de fruta comercial con 50 % de jugo de naranja

JFC 4: jugo de fruta comercial con 50 % de jugo de pomelo

JNN: jugo de naranja natural

JPN: jugo de pomelo natural



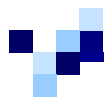
## 4.6. CONCLUSIONES PARCIALES

En este trabajo se diseñó un nuevo sistema FIA con fotodegradación en línea y detección espectrofotométrica para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales en muestras de jugos de fruta comerciales y naturales.

El sistema FIA es extremadamente simple y muy accesible para los laboratorios de rutina. Además, la lámpara germicida para la fotorreacción es económica y fácil de conectar en línea.

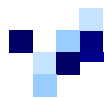
Este método podría ser una contribución importante al análisis cuantitativo, para determinar analitos fotorreactivos en muestras de alimentos. Además, ofrece las ventajas de un análisis rápido, bajo riesgo de contaminación, bajo consume de reactivos y un pretratamiento simple como filtración y dilución. Por otro lado, este método es una contribución al control de calidad de jugos de fruta.

La exactitud fue testada con un ensayo de recuperación y las recuperaciones obtenidas fueron en el rango 96,4 y 108,3 % para el ácido ascórbico y 91,0 y 113,2 % para los azúcares totales.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Código Alimentario Argentino, Capítulo XII, Artículo 996 (actualizado al mes de junio de 2007).
- [2] Codex Alimentarius, Norma General para Zumos (Jugos) y Néctares de Frutas, (CODEX STAN 247-2005).
- [3] O. R. Fennema, Química de los Alimentos, Cáp. 16, pág. 1126, 2ª ed., Ed. Acribia (2000).
- [4] L. Tian, L. Chen, L. Liu, N. Lu, W. Song, H. Xu, Sensors and Actuators B 113, 150 (2006).
- [5] Codex Alimentarius, Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (Cuadro II) (actualizado al 2008).
- [6] Código Alimentario Argentino, Capítulo XVIII, RES GMC N° 86/96, (actualizado al mes de junio de 2007).
- [7] Codex Alimentarius, Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (CODEX STAN 192-1995), Anexo A (actualizado al 2008).
- [8] F. Chinnici, U. Spinabelli, C. Riponi, A. Amati, J. Food Comp. and Analysis, 18, 121 (2005).
- [9] J. Li, M. Chen, Y. Zhu, J. Chrom. A, 1155, 50 (2007).
- [10] S. Dong, S. Zhang, X. Cheng, P. He, Q. Wang, Y. Fang, J. Chrom. A, 1161, 327 (2007).
- [11] G. Xu, D. Liu, J. Chen, X. Ye, Y. Maa, J. Shi, Food Chemistry, 106, 545 (2008).
- [12] P. Komthong, N. Igura, M. Shimoda, Food Chemistry, 100, 1342 (2007).
- [13] Y. Tang, M. Wu, Talanta, 65, 794 (2005).



- [14] J. Liu, J. Itoh, *Spectrochimica Acta Part A*, 67, 455 (2007).
- [15] C. K. Pires, A. F. Lavorante, L. M. T. Marconi, S. R. P. Meneses, E. A. G. Zagatto, *Microchemical Journal*, 83, 70 (2006).
- [16] *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, pág. 1058, 15<sup>th</sup> ed., Arlington, USA, (1990).
- [17] Z. Füzfai, I. Molnár-Perl, *J. of Chrom. A*, 1149, 88 (2007).
- [18] T. Soga, M. Serwe, *Food Chemistry*, 69, 339 (2000).
- [19] E. Maestre, I. Katakis, A. Narváez, E. Domínguez, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 774 (2005).
- [20] W. Surareungchai, W. Deepunya, P. Tasakorn, *Anal. Chim. Acta*, 448, 215 (2001).
- [21] B. Roig, O. Thomas, *Anal. Chim. Acta*, 477, 325 (2003).
- [22] V. Usenik, J. Fabcic, F. Stampar, *Food Chemistry*, 107, 185 (2008).
- [23] R. Demadrille, A. Ravourdin, M. Campredonc, G. Giusti, *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 168, 143 (2004).
- [24] K. Blau, J. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, page 136, 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley, New York (1993).
- [25] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Data Handling in Science and Technology 20A: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Ed. Elsevier (1997).
- [26] H. D. Belitz, W. Grosch, *Química de los alimentos*, Cap. 18, pág. 913, 2<sup>a</sup> ed., Ed. Acribia (1997).



# *Capítulo 5*

DETERMINACIÓN  
SIMULTÁNEA DE AMARANTO,  
AMARILLO OCASO Y  
TARTRAZINA EMPLEANDO  
ESPECTROMETRÍA UV-V Y  
MCR-ALS



## 5.1. INTRODUCCIÓN

Los colorantes, son aditivos alimentarios, que influyen en las características organolépticas de los alimentos. Estas sustancias aportan, intensifican o restauran el color de un alimento para compensar la pérdida del mismo durante las etapas de elaboración y almacenamiento. El empleo de colorantes tiene como objetivo mejorar el aspecto visual de los alimentos y poder dar respuesta a las expectativas del consumidor. Son ampliamente utilizados en repostería, golosinas, jugos de frutas y gaseosas, galletitas, helados, etc.

Los colorantes sintéticos empleados en la industria alimentaria, presentan una serie de ventajas frente a los naturales, como resistencia a los tratamientos térmicos, alta estabilidad a la luz, oxígeno y pH extremos, color uniforme, baja contaminación microbiológica y bajo costo <sup>[1]</sup>. Sin embargo, estos aditivos son generalmente tóxicos y tienen asociados una serie de efectos secundarios, tales como: urticaria, asma, rinitis, angioedema, dermatitis de contacto y fotodermatitis <sup>[2]</sup>. Además, el consumo de colorantes puede generar hiperactividad en los niños. McCann y col. <sup>[3]</sup> concluyeron que los alimentos que presentan estos aditivos tienden a incrementar los niveles de hiperactividad en los niños de la población en general y no sólo en aquellos que ya tienen diagnosticado un trastorno de déficit de atención con hiperactividad. Entre los efectos provocados por los colorantes se destacaron un aumento de comportamientos impulsivos y la dificultad para concentrarse, especialmente en la lectura. Luego de varios meses la Agencia de Seguridad Alimentaria del Reino Unido (FSA) ha pedido, en abril de 2008, a los fabricantes de alimentos que retiren varios aditivos que, según los últimos estudios, provocan trastornos en el comportamiento infantil.

Dentro de los colorantes artificiales, los colorantes azoicos forman parte de una familia de sustancias orgánicas, caracterizadas por la presencia de un grupo *azo*



(-N=N-) conjugado con *anillos aromáticos* [4]. Todos ellos se obtienen por síntesis química, no existiendo ninguno en la naturaleza.

El número de colorantes autorizado en este grupo, actualmente es pequeño en comparación con los existentes, muchos de los cuales se utilizaron antiguamente y luego se prohibieron, por ser potencialmente peligrosos para la salud. Demostraron ser cancerígenos, poco polares y solubles en grasas, por lo que atravesaban con cierta facilidad el tracto intestinal, incorporándose al organismo. Uno de los colorantes más peligrosos dentro de este grupo fue el llamado “amarillo mantequilla”, dimetilazobenceno, utilizado como colorante de grasas, el cual en 1937 se descubrió que era un potente cancerígeno hepático.

Los colorantes azoicos, que se utilizan actualmente, tienen como característica general absorberse muy poco en el intestino, siendo destruidos en su mayoría por la flora bacteriana intestinal. Los fragmentos de colorante que son asimilados se eliminan por la vía urinaria y/o biliar.

Dentro de este grupo se encuentran: tartrazina, amarillo ocaso, azorrubina carmoisina, amaranto, rojo ponceau 4R, rojo 2G, rojo allura, negro brillante, marrón FK, marrón HT, litol rubina BK. El rojo 2G, marrón FK y marrón HT se utilizan, entre los países desarrollados, sólo en el Reino Unido. El litol rubina BK se utiliza exclusivamente para teñir la corteza de algunos quesos.

En este trabajo de Tesis se estudiaron, dentro de este grupo, al amaranto (AM), amarillo ocaso (AO) y tartrazina (TAR) (**Figura 5.1.**), los cuales se utilizan en alimentos, bebidas, medicamentos y cosméticos [5].

El amaranto (AM), también llamado sal trisódica del ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-3-6-disulfónico, es un colorante rojo utilizado como aditivo alimentario desde principios de siglo y en 1970 se comenzó a cuestionar la seguridad de su empleo. Dos grupos de investigadores rusos publicaron que este colorante era capaz de producir en

animales de experimentación, cáncer y defectos en los embriones [6]. Estudios realizados, luego en Estados Unidos dieron resultados contradictorios. También se observó que este colorante puede producir alteraciones en los cromosomas. Aunque no se pudieron confirmar fehacientemente los riesgos del amaranto, la administración estadounidense lo prohibió en 1976, por no considerarlo seguro. Su uso está aceptado en la Comunidad Europea, pero países como Francia e Italia han prohibido el empleo del mismo [4]. Este colorante presenta una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0-0,5 mg/kg (JECFA (1984)). En nuestro país el Código Alimentario Argentino admite una concentración máxima en bebidas analcohólicas de 0,005 g % (m/v) [7].

El amarillo ocaso (AO), también llamado disodio-6-hidroxi-5-(4-sulfonatofenilazo)-2-naftaleno-sulfonato, es empleado como colorante desde 1929. Se lo utiliza para dar color en bebidas de naranja, helados, caramelos, productos para aperitivo, postres, etc. En 1984 se le atribuyeron efectos cancerígenos, aunque esta afirmación no llegó a demostrarse. Como la mayoría de los colorantes azoicos, hay estudios que indican que producen alergias y trastornos del comportamiento en niños. La IDA es de 0-2,5 mg/kg (JECFA (1982)). En nuestro país el Código Alimentario Argentino admite una concentración máxima en bebidas analcohólicas de 0,01 g % (m/v) [7].

La tartrazina (TAR), también conocida como trisodio-5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonato-fenilazo)-H-pirazol-3-carboxilato, es uno de los colorantes artificiales ampliamente utilizado desde 1916 en productos de repostería, derivados cárnicos, sopas preparadas, conservas vegetales, salsas, helados, bebidas de naranja y limón, etc. Su uso está autorizado en más de sesenta países, incluyendo, los de la Unión Europea y Estados Unidos. Confiere a los alimentos y bebidas un tono amarillo anaranjado, dependiendo de la cantidad añadida. También se utiliza para obtener colores verdes, al mezclarlo con colorantes azules. La IDA es de 0-7,5 mg/kg (JECFA

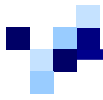
(1964)). El Código Alimentario Argentino admite una concentración máxima en bebidas analcohólicas de 0,01 g % (m/v) <sup>[7]</sup> y el Artículo 996 del mismo, establece que: *“los productos que contengan Tartrazina deberán declarar su presencia en el rotulado mediante su nombre específico, en las proximidades de la denominación”*.

En la literatura, existen diferentes técnicas para la determinación de AM, AO y TAR.

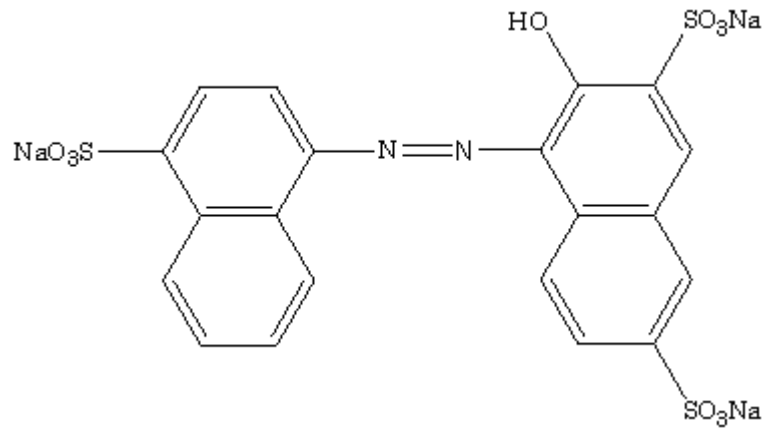
Fan y col. <sup>[8]</sup> estudiaron la degradación electroquímica del amaranto utilizando un electrodo de fibra de carbón activado y Gosetti y col. <sup>[9]</sup> estudiaron la degradación del AO en bebidas comerciales utilizando HPLC-MS.

Soponar y col. <sup>[10]</sup> determinaron el contenido de AO, TAR y otros colorantes, en jugos de fruta concentrado, utilizando cromatografía de alta resolución en capa fina. También, para determinar estos colorantes en leches saborizadas se utilizó la técnica de electroforesis capilar <sup>[11]</sup>. Por otro lado, Capitán-Vallvey y col. <sup>[12]</sup> determinaron, junto a otros colorantes, AO y TAR en bebidas de diferentes sabores utilizando espectrometría en fase sólida y calibración multivariada. Por otro lado, Dinç y col. <sup>[13]</sup> analizaron AO, TAR y otros colorantes mediante un análisis espectrométrico de multicomponente en bebidas bajas calorías en polvo por espectroscopia derivativa por mínimos cuadrados inversos y componentes principales. Vidotti y col. <sup>[14]</sup> determinaron además de AO y TAR, otros colorantes desarrollando un método cromatográfico “green” en jugos artificiales y gelatinas.

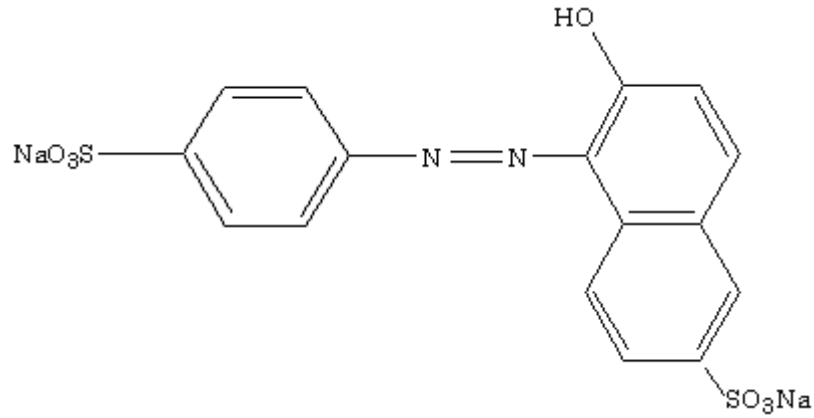
Para la determinación simultánea de AM, AO y TAR, entre otros, se utilizaron la técnica de electroforesis capilar <sup>[15]</sup>, HPLC con detección UV-EMS <sup>[16]</sup>, HPLC con detección UV-DAD <sup>[1]</sup>, HPLC en fase reversa <sup>[17]</sup>. Por otro lado Ni y col. <sup>[18]</sup> realizaron la determinación simultánea de AM, AO y TAR, junto a otros colorantes, empleando datos espectrométricos los cuales fueron procesados a través de herramientas quimiométricas (CLS, PLS, ITTFA, PCR).



a.



b.



c.

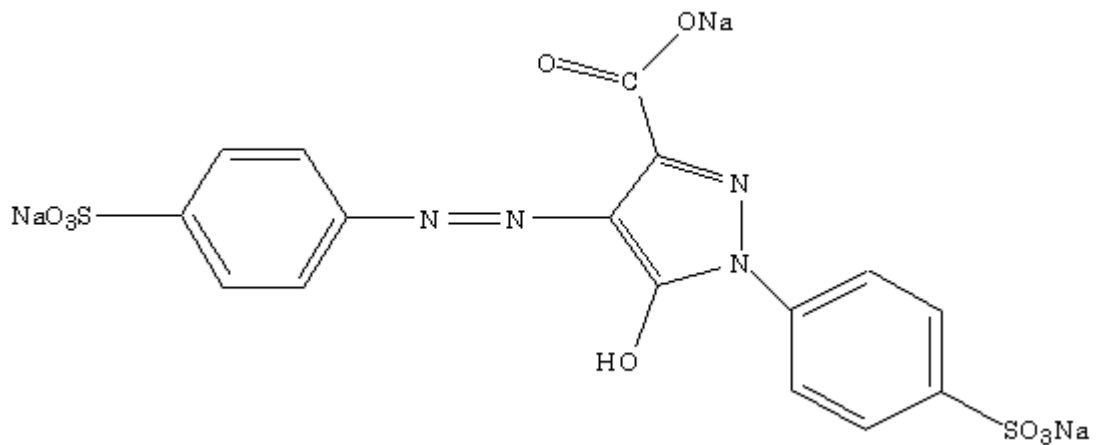


Figura 5.1. Estructura química de: a. AM, b. AO, c. TAR

## **5.2. OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo consistió en determinar simultáneamente amaranto, amarillo ocaso y tartrazina en gaseosas, aguas saborizadas y bebidas hidratantes.

## **5.3. FUNDAMENTO**

Para llevar a cabo el objetivo de este trabajo se utilizó espectrometría de absorción molecular y Resolución Multivariada de Curvas (optimización mediante Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS)) como herramienta quimiométrica.

### **5.3.1. Resolución Multivariada de Curvas. Optimización mediante Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS)**

La Resolución Multivariada de Curvas (MCR) tiene como finalidad aislar, resolver y cuantificar las fuentes de variabilidad presentes en un determinado conjunto de datos. A diferencia de los métodos univariados, que analizan una respuesta puntual del sistema en estudio para una única variable (por ejemplo, la respuesta para una sola longitud de onda, cuando se trata de datos espectroscópicos), los métodos multivariados analizan la respuesta para múltiples variables (por ejemplo, todo el espectro). La Resolución Multivariada de Curvas puede utilizarse para resolver componentes presentes en muestras de naturaleza y composición desconocida <sup>[19, 20, 21, 22]</sup>, tanto los analitos de interés como eventuales interferencias.

La condición habitual, cuando se utiliza MCR, es que los datos sigan un modelo lineal <sup>[23]</sup> (por ejemplo, la ley de Lambert-Beer para datos espectroscópicos), lo cual puede expresarse como:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad (\text{Ecuación 5.1.})$$

donde  $\mathbf{D}$  es la matriz de datos adquiridos a diferentes valores de cierta variable (longitud de onda, pH, concentración, potencial, etc.),  $\mathbf{C}$  y  $\mathbf{S}^T$  están relacionadas con las concentraciones y los perfiles de respuesta puros de las variables presentes en el sistema, respectivamente, y  $\mathbf{E}$  es la matriz de los residuales, que contiene información no explicada por el producto  $\mathbf{CS}^T$ . Las dimensiones de las cuatro matrices son  $\mathbf{D}$  ( $I \times J$ ),  $\mathbf{C}$  ( $I \times N$ ),  $\mathbf{S}$  ( $J \times N$ ) y  $\mathbf{E}$  ( $I \times J$ ), donde  $I$  es el número de mediciones realizadas (por ejemplo, número de espectros),  $J$  es el número de variables registradas para cada medición (por ejemplo, número de longitudes de onda) y  $N$  es el número de especies químicas presentes.

Para conseguir la descomposición descrita en la *Ecuación 5.1.*, se implementan distintas técnicas de análisis multivariado, ensambladas en un solo método que consta de diferentes partes <sup>[24]</sup>:

- ✓ *Determinación del número de componentes:* en primer lugar se determina el número de componentes que contribuyen significativamente a la respuesta del sistema. Si las especies químicas presentes poseen una contribución a la varianza de los datos mayor que el ruido, el número de componentes o factores puede estimarse directamente evaluando los respectivos valores singulares. En esta Tesis, el número de factores fue estimado mediante la Descomposición en Valores Singulares (*Singular Value Decomposition, SVD*).

Este algoritmo se basa en el teorema del álgebra matricial que establece que una matriz  $\mathbf{D}$  de dimensiones  $I \times J$  puede descomponerse en el producto de tres matrices  $\mathbf{U}$  ( $I \times K$ ),  $\mathbf{W}$  ( $K \times K$ ) y  $\mathbf{V}^T$  ( $K \times J$ ), siendo  $K$  igual al menor valor entre  $I$  y  $J$ .

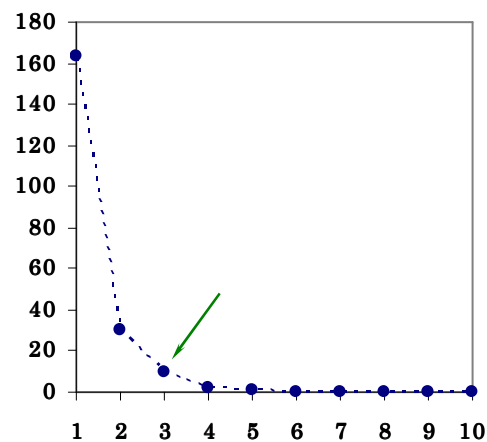
$$\mathbf{R} = \mathbf{U}\mathbf{W}\mathbf{V}^T \quad (\text{Ecuación}$$

5.2.)

Los elementos de la diagonal de  $\mathbf{W}$  están definidos como valores positivos, mientras que los valores fuera de la diagonal son cero. Los vectores (columnas) de las matrices  $\mathbf{U}$  y  $\mathbf{V}$  son ortonormales, lo que implica que los productos  $\mathbf{U}^T\mathbf{U}$  y  $\mathbf{V}^T\mathbf{V}$  son iguales a la matriz identidad [25].

La matriz  $\mathbf{U}$  posee información acerca de las filas de de la matriz  $\mathbf{D}$ , por lo que expresa las relaciones entre los objetos o muestras, mientras que la matriz  $\mathbf{V}^T$  contiene información referida a las columnas de la matriz  $\mathbf{D}$ , y por lo tanto refleja la relación existente entre las variables. Los valores de la diagonal de la matriz  $\mathbf{W}$  son llamados *valores singulares* y están ordenados de mayor a menor. Cuando los valores singulares se representan frente al número de componentes, es posible extraer información acerca del número de factores o componentes del sistema en estudio (*Figura 5.2*). Aquellos factores que tengan asociados valores singulares bajos, generalmente recogen información sobre el ruido asociado a las medidas experimentales.

La determinación del número de componentes o factores significativos es importante puesto se asume que corresponde al número de especies químicas que ocasionan la variabilidad en la matriz de respuestas (matriz  $\mathbf{D}$ ), en ausencia de ruido.



**Figura 5.2.** Descomposición en valores singulares de una matriz de datos. La flecha indica el número de componentes principales significativos

✓ *Construcción de la estima inicial:* las matrices  $\mathbf{C}$  y  $\mathbf{S}^T$  (*Ecuación 5.1.*) se determinan mediante la aplicación de un algoritmo de optimización (*Mínimos Cuadrados Alternados*) que requiere establecer una estima inicial para  $\mathbf{C}$  o  $\mathbf{S}^T$  como punto de partida. Dichas estimas pueden obtenerse a partir de técnicas basadas en la detección de variables puras o en el análisis de componentes principales, entre otras. En esta Tesis se utilizó el algoritmo SIMPLISMA (de la expresión inglesa SIMPLe-to-use Interactive Self-modelling Mixture Análisis <sup>[26]</sup> que permite hallar variables puras en un conjunto de datos experimentales sin la necesidad de realizar el análisis de componentes principales. El procedimiento se basa en la evaluación de la desviación estándar relativa de las columnas de la matriz de datos:

$$p_i = \frac{S_i}{m_i} \quad (\text{Ecuación 5.3.})$$

siendo  $p$  la desviación estándar relativa,  $S$  la desviación estándar y  $m$  la media para un columna  $i$ . Una desviación estándar relativa grande indica una alta pureza para



esa columna. Con el fin de evitar la sobrevaloración de columnas con un valor medio pequeño (generalmente correspondientes al ruido) se introduce un factor de corrección  $f$  (normalmente 0,1 o 1 según el nivel de ruido aceptado).

$$p_i = \frac{S_i}{m_i + f} \tag{Ecuación 5.4.}$$

El procedimiento consiste, en primer lugar, en hallar la columna con la mayor desviación estándar relativa. Seguidamente, se procede a la normalización de dicha columna. La segunda variable de mayor pureza, además de poseer la mayor desviación estándar, deberá presentar la mínima correlación con la primera variable pura encontrada. Por lo tanto se calcula un factor de ponderación,  $w$ , que tendrá un valor más alto en la medida que las variables no estén correlacionadas, mientras que para variables correlacionadas dará un valor cercano a cero [26].

Así, para las siguientes variables a analizar, se aplica el factor de ponderación de forma que la expresión de la **Ecuación 5.4.** cambia ligeramente

$$p_i = w_i \left( \frac{S_i}{m_i + f} \right) \tag{Ecuación 5.5.}$$

El algoritmo seleccionará el máximo  $p_i$ , que corresponderá a la siguiente variable de mayor pureza, y así sucesivamente hasta hallar la totalidad de variables puras.

✓ *Mínimos Cuadrados Alternados:* las estimas iniciales para  $\mathbf{C}$  o  $\mathbf{S}^T$  se optimizan resolviendo la **Ecuación 5.1.** iterativamente mediante el *Método de Mínimos Cuadrados Alternados.* A cada iteración del proceso de optimización se obtienen nuevas estimas de las matrices  $\mathbf{C}$  o  $\mathbf{S}^T$ :



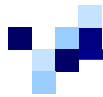
$$\mathbf{C}^+\mathbf{D} = \mathbf{C}^+\mathbf{C}\mathbf{S}^T = \mathbf{S}^T \quad (\text{Ecuación 5.6.})$$

y

$$\mathbf{D}(\mathbf{S}^T)^+ = \mathbf{C}(\mathbf{S}^T)(\mathbf{S}^T)^+ = \mathbf{C} \quad (\text{Ecuación 5.7.})$$

donde la matriz  $\mathbf{D}$  es la matriz de los datos experimentales,  $\mathbf{C}^+$  es la pseudoinversa <sup>[27]</sup> de la matriz  $\mathbf{C}$  y  $(\mathbf{S}^T)^+$  es la pseudoinversa matriz  $\mathbf{S}^T$ .

Desafortunadamente, cuando se trabaja con datos bilineales, no existen soluciones únicas para la descomposición planteada en la *Ecuación 5.1*. En ausencia de otra información  $\mathbf{C}$  y  $\mathbf{S}^T$  no se pueden distinguir de otras matrices  $\mathbf{C}'$  y  $\mathbf{S}'^T$  que permiten obtener la misma matriz de residuales  $\mathbf{E}$ , puesto que todas las soluciones para la descomposición de  $\mathbf{D}$  son combinaciones lineales unas de otras <sup>[28, 29]</sup>. Mediante la utilización de información adicional en forma de restricciones, basadas en el conocimiento físico-químico del sistema en estudio, es posible reducir considerablemente el número de soluciones posibles e incluso obtener una solución única al problema. Una restricción puede ser definida como cualquier propiedad matemática o química que es sistemáticamente satisfecha por el sistema completo o por algunas de sus contribuciones puras <sup>[30]</sup>. Básicamente, el algoritmo ALS permite obtener soluciones con significado químico, a partir de estimaciones iniciales que, bajo determinadas restricciones, se van optimizando a cada paso del proceso de iteración. Las restricciones aplicadas pueden proceder de la naturaleza misma del sistema químico (en nuestro caso se ha aplicado la restricción *No-negatividad*, que obliga a que todos los valores de un perfil (de concentración o respuesta) sean mayores o iguales a cero). También pueden aplicarse otras restricciones, si se posee información adicional acerca del sistema (en nuestro caso, se conocen *a priori* los espectros puros de los analitos de interés y en cada iteración los perfiles conocidos se mantuvieron invariables <sup>[31, 23, 29]</sup>. Cuando, mediante ALS, se



analizan simultáneamente distintos conjuntos de datos correspondientes a un mismo problema en estudio, se pueden aplicar restricciones adicionales con el fin de establecer correspondencias entre las mismas especies presentes en los diferentes conjuntos de datos, o que especies comunes en las distintas matrices de datos tengan el mismo perfil de respuesta. Este tipo de restricción también ha sido utilizada en este trabajo.

### *Parámetros de calidad del ajuste*

Existen diferentes parámetros a partir de los cuales se puede obtener información acerca de la bondad del ajuste realizado mediante MCR-ALS. Uno de ellos se denomina *falta de ajuste* (*lof*, del inglés “*lack of fit*”) y está definido por la **Ecuación 5.7**:

$$lof = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2}} \quad (\text{Ecuación 5.7.})$$

donde  $d_{ij}$  representa a cada uno de los elementos de la matriz experimental  $\mathbf{D}$  y  $\hat{d}_{ij}$  representa los elementos calculados por el modelo para el producto  $\mathbf{CS}^T$ .

Otro parámetro, que ofrece una información similar al anterior, es el porcentaje de varianza explicada por el producto  $\mathbf{CS}^T$ :

$$R^2 = \frac{\sum_i \sum_j \hat{d}_{ij}^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2} \quad (\text{Ecuación 5.8.})$$

Ambos parámetros se tuvieron en cuenta para la selección del modelo adecuado al objetivo planteado.



## 5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.4.1. *Reactivos y soluciones*

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas con drogas y reactivos de calidad analítica y con agua ultra pura (18m $\Omega$ ) utilizando un sistema de purificación de agua B-pure.

- Solución patrón de amaranto 52 mg L<sup>-1</sup>: se preparó disolviendo 2,6 mg de amaranto (Anedra) en 50,0 mL de agua.
- Solución patrón de amarillo ocaso 56 mg L<sup>-1</sup>: se pesó 2,8 mg de amarillo ocaso FCF (Aldrich) y se llevó a 50,0 mL con agua.
- Solución patrón de tartrazina 53 mg L<sup>-1</sup>: se preparó disolviendo 2,65 mg de tartrazina (Anedra) y se llevó a 50,0 mL con agua.
- Solución de NaOH 0,1 M: se pesó 4,0 g de NaOH (Cicarelli) y se llevó a 1000,0 mL con agua.
- Solución de HCl 0,1 M: se diluyó 8,3 mL de HCl (Merck, 37 %,  $\delta= 1,19$  g mL<sup>-1</sup>) y se llevó 1000,0 mL con agua.

### 5.4.2. *Instrumentación*

- Espectrofotómetro Agilent 8453 con arreglo lineal de diodos y ancho de banda espectral de 1 nm.
- Celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico (NSG Precision Cells, Inc.).
- Las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.
- Los espectros se registraron desde 190 a 800 nm, en pasos de 1 nm.

- ☑ Todos los espectros fueron transferidos al formato ASCII y se utilizó el programa MATLAB <sup>[32]</sup> y las subrutinas necesarias para llevar a cabo la Resolución Multivariada de Curvas optimizada por Mínimos Cuadrados Alternados desarrolladas por Tauler y De Juan <sup>[33]</sup>.

### 5.4.3. Procedimiento

Para llevar a cabo el análisis quimiométrico por MCR-ALS se registraron los espectros de absorción molecular de las muestras a analizar, de patrones puros para cada colorante y de mezclas sintéticas, entre 359 y 610 nm.

#### *I- Muestras reales*

Las muestras utilizadas para la determinación de AM, AO y TAR fueron gaseosas (G), aguas saborizadas (AS) y bebidas hidratantes (BH), todas adquiridas en un supermercado local. Estas muestras contenían uno o dos de los colorantes cuyos valores de concentración no figuraban en el rótulo de las mismas.

Las muestras fueron homogeneizadas y filtradas por medio de un filtro de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro. Posteriormente se realizó una dilución con HCl 0,1M, suponiendo que contenían una cantidad de colorante equivalente al máximo permitido por el Código Alimentario Argentino <sup>[7]</sup>.

*II- Patrones puros*

Se prepararon patrones puros de cada analito en un rango de concentraciones comprendido entre 0,01-1,8 mg L<sup>-1</sup> para amaranto, entre 0,08-4,4 mg L<sup>-1</sup> para amarillo ocaso y entre 0,04-1,8 mg L<sup>-1</sup> para tartrazina. Todas las soluciones se prepararon en HCl 0,1 M. Con los datos obtenidos se realizaron las curvas de calibrado respectivas para cada colorante.

*III- Mezclas sintéticas*

Las muestras seleccionadas para el análisis de colorantes contienen uno o dos de los analitos estudiados. En función de esto y para evaluar el error de predicción del método quimiométrico, se prepararon cuatro mezclas sintéticas. En la **Tabla 5.1.** se muestran las concentraciones de AM, AO y TAR en cada mezcla las cuales se prepararon por dilución de las soluciones patrones con HCl 0,1 M.

**Tabla 5.1.** Mezclas sintéticas para AM, AO y TAR en mg L<sup>-1</sup> de testigo

MEZCLA	AM	AO	TAR
1	5,4	5,6	0
2	0	5,6	0
3	0	5,6	5,4
4	0	0	5,4



### 5.4.3.1. Aplicación de MCR-ALS

- ✓ *Selección de longitudes de onda:* se realizó de manera visual, eliminando aquellas longitudes de onda donde no se observaban bandas de los colorantes, y prescindiendo de la región ultravioleta del espectro donde existe superposición de bandas con conservantes y edulcorantes presentes en las muestras reales.
- ✓ *Organización de los datos en matrices:* luego de la selección de longitudes de onda se construyó una matriz aumentada **Z** (de tamaño 55x252) a lo largo de las columnas que constó de las siguientes submatrices:
  - Submatriz **A**, de tamaño 5x252, compuesta por los espectros correspondientes a las cinco soluciones estándar de AM, registrados entre 359 y 610 nm.
  - Submatriz **B**, de tamaño 5x252, compuesta por los espectros correspondientes a las cinco soluciones estándar de AO, registrados entre 359 y 610 nm.
  - Submatriz **C**, de tamaño 5x252, compuesta por los espectros correspondientes a las cinco soluciones estándar de TAR, registrados entre 359 y 610 nm.
  - Submatrices de la **D** a la **G**, cada una de tamaño 1x252 correspondientes a las cuatro mezclas conocidas de los analitos utilizadas para evaluar el error de predicción, registrados entre 359 y 610 nm.
  - Submatrices de la **H** a la **Q**, cada una de tamaño 3x252 correspondientes a cada una de las muestras reales y dos agregados conocidos, registrados entre 359 y 610 nm.
  - Submatrices de la **R** a la **T**, cada una de tamaño 2x252 correspondientes a cada una de las mezclas utilizadas en la validación del método y un agregado conocido registrados entre 359 y 610 nm.
- ✓ *Determinación del número de componentes:* se realizó utilizando la descomposición en valores singulares (SVD). Se asume que los valores singulares

asociados a los compuestos químicos presentes en las muestras son mucho mayores que otras posibles contribuciones, como el error y la deriva instrumental. Por lo tanto el rango químico de las matrices de datos fue estimado simplemente por inspección visual de las tablas de valores singulares de la matriz aumentada **Z**.

✓ *Construcción de la estima inicial:* se utilizó el algoritmo SIMPLISMA para seleccionar los espectros más puros en la matriz de datos **Z**.

✓ *Optimización mediante ALS:* el algoritmo ALS fue aplicado bajo una serie de restricciones para obtener una solución consistente con el problema químico y restringir el número de soluciones posibles. Las restricciones fueron las siguientes:

- a) Los valores de los espectros de cada compuesto deben ser no negativos.
- b) Los valores de las concentraciones deben ser no negativos.
- c) Se aplicó normalización a los perfiles espectrales.
- d) Se aplicó una restricción de igualdad a los perfiles espectrales, de manera que los espectros de cada analito puro (correspondientes a la solución de mayor concentración en la curva de calibrado) se mantuvieron inamovibles a lo largo del proceso de iteración.
- e) Correspondencia entre las diferentes especies en las submatrices de la matriz aumentada.

## 5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

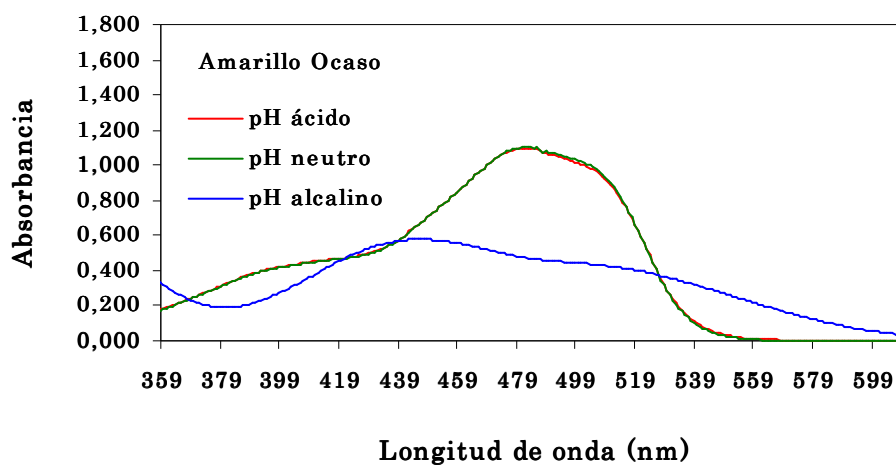
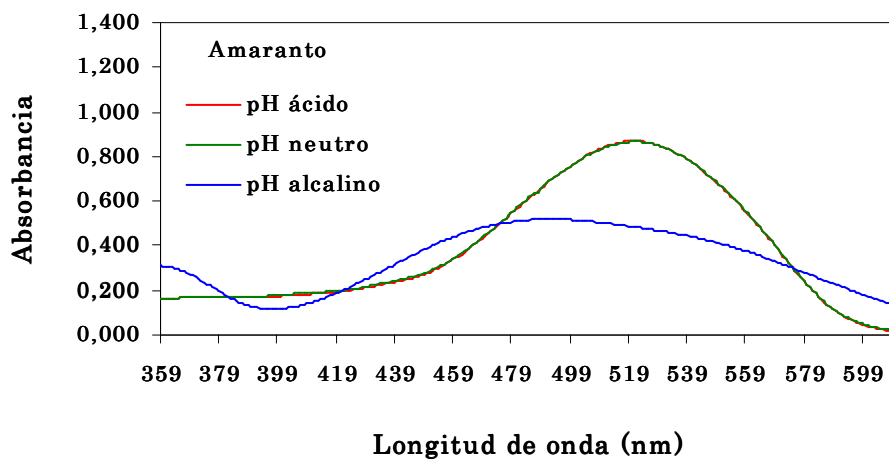
### 5.5.1. Espectros de absorción de AM, AO y TAR

Para estudiar el comportamiento de AM, AO y TAR bajo la influencia del pH, se registraron los espectros de absorción UV-V utilizando HCl 0,1 M, H<sub>2</sub>O e NaOH 0,1 M.





Para ello se utilizaron soluciones de AM, AO y TAR de concentración 25,5; 26,5 y 25,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En la **Figura 5.3** se muestran, los espectros de absorción de cada colorante (AM, AO y TAR) a pH ácido, neutro y alcalino. Como se observa, no existen variaciones en el máximo de absorción en los tres colorantes a pH ácido y neutro, mientras que la señal para los tres colorantes disminuye a pH alcalino y los máximos de absorción se desplazan hacia menores longitudes de onda.



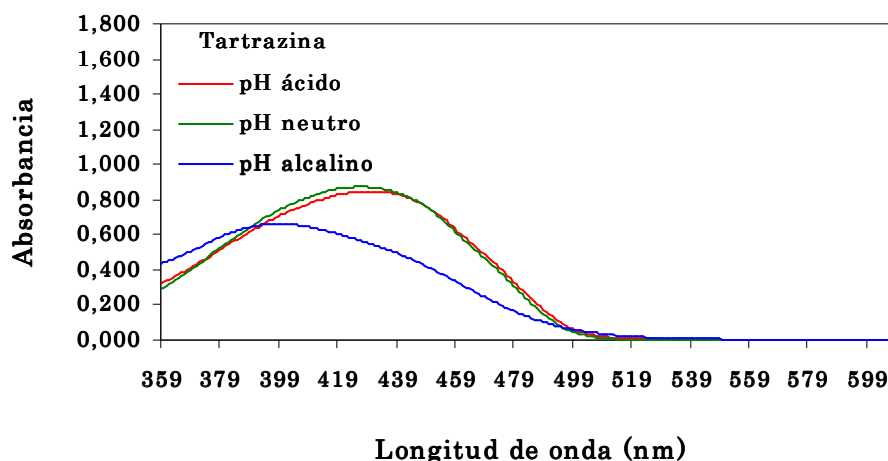
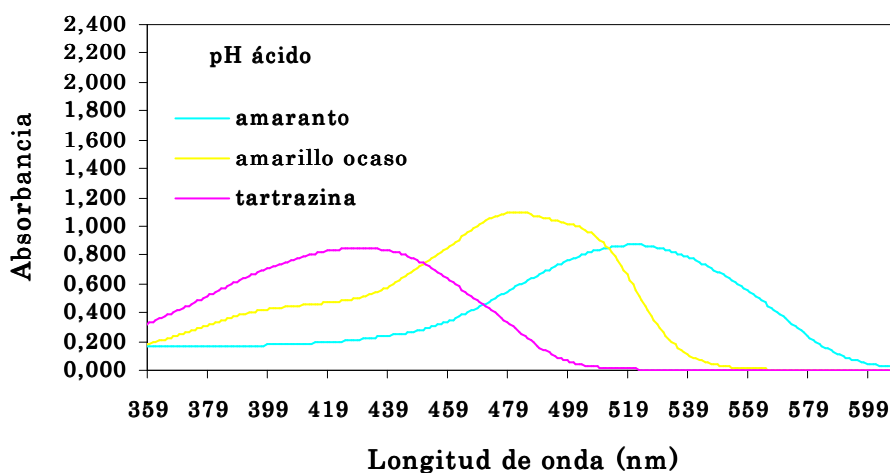


Figura 5.3. Espectros de absorción de AM, AO y TAR a pH ácido, neutro y alcalino

Para poder realizar el estudio quimiométrico y de acuerdo a lo realizado anteriormente, se procede a seleccionar el pH adecuado en donde las bandas de absorción de AM, AO y TAR presentan la región óptima de estudio. En la **Figura 5.4.** se muestran los espectros a cada pH (ácido, neutro y alcalino) de AM, AO y TAR. La menor superposición de las bandas espectrales se obtiene a pH ácido y neutro. El pH seleccionado es ácido ya que coincide con el pH de las muestras comerciales utilizadas.



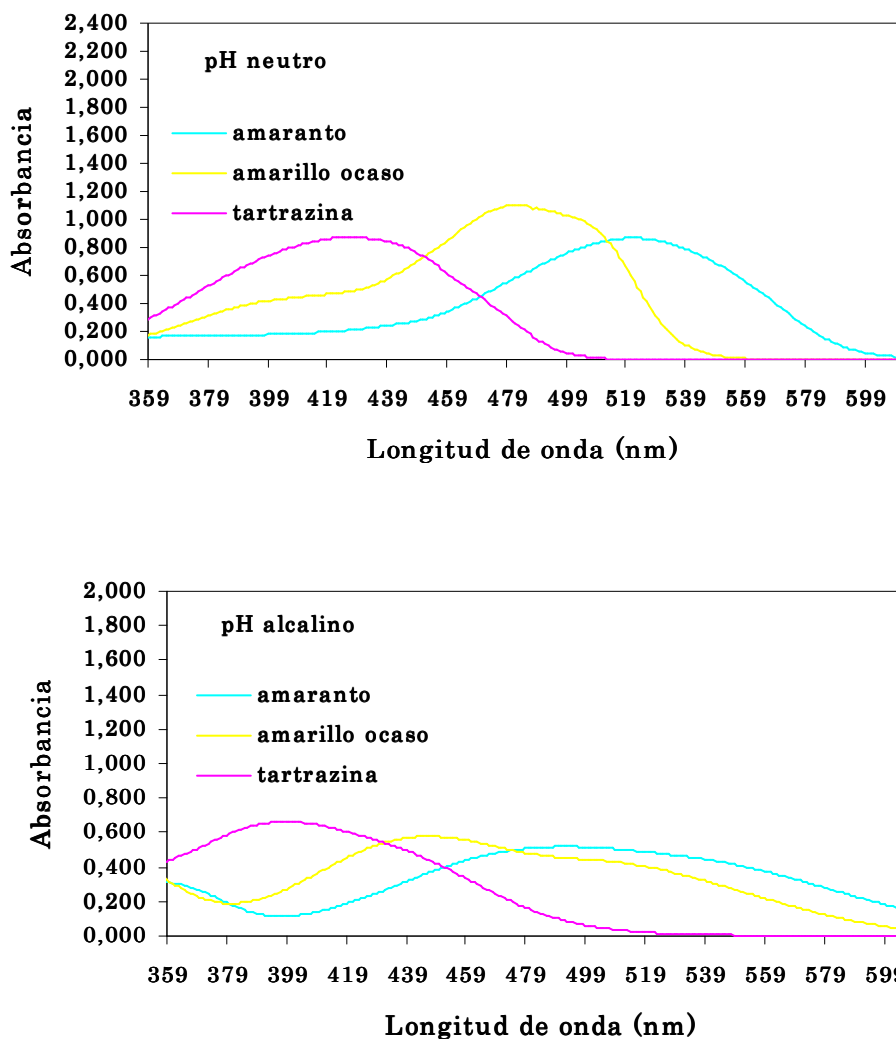


Figura 5.4. Espectros de AM, AO y TAR a cada pH (ácido, neutro y alcalino)

### 5.5.2. Análisis de datos

#### I- Determinación del número de componentes

Una vez seleccionado el pH adecuado, se registraron los espectros y se organizaron en matrices, según lo indicado en la **sección 5.4.3.1**. El primer paso en la aplicación multivariada de curvas es la determinación del número de componentes que



causan la variabilidad observada en el conjunto de datos. Para ello se realizó el estudio de los valores singulares correspondientes a la matriz aumentada  $Z$  (*tabla 5.2*). En la dicha tabla se puede observar la presencia de cinco factores significativos, en lugar de los tres factores esperados, correspondientes a los tres analitos estudiados. Por lo tanto, es de suponer, que existen otras especies, presentes en las muestras, que absorben en la misma región espectral. En consecuencia, se decidió trabajar con cinco factores de manera de modelar también esas especies desconocidas.

*Tabla 5.2. Valores singulares de la matriz Z*

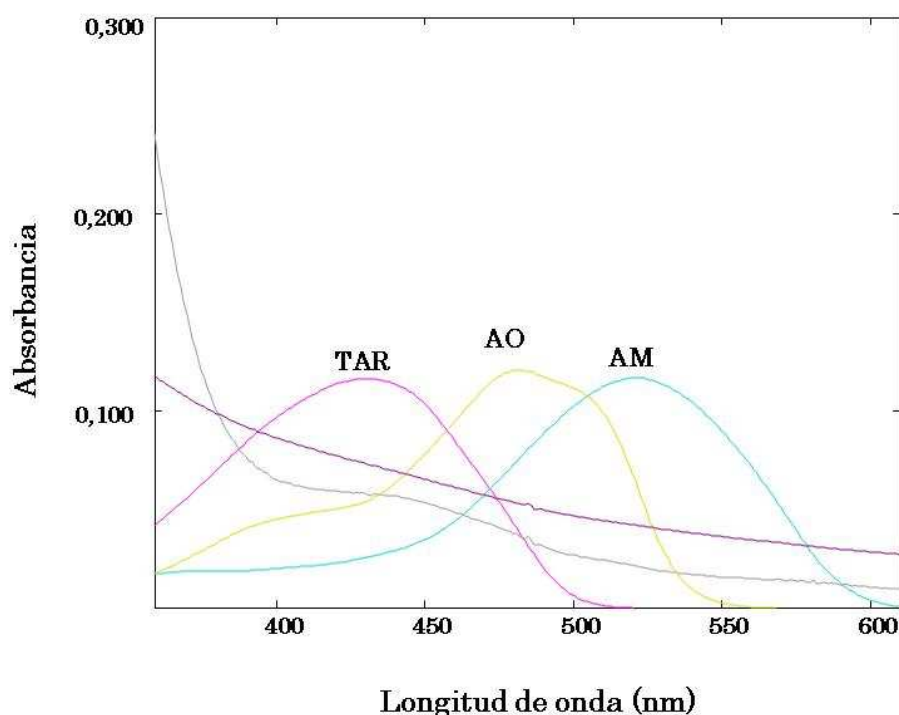
<b>VALORES SINGULARES</b>
47,0
12,1
5,90
3,40
1,20
0,30
0,10
<0,10
<0,10
<0,10

## *II- Construcción de la estima inicial*

En la *Figura 5.5* se muestran los espectros seleccionados cuando se aplicó SIMPLISMA a la matriz aumentada  $Z$ . El espectro de mayor pureza, en términos de desviación estándar relativa, correspondió al testigo de máxima concentración de la curva de calibrado de la TAR. El segundo espectro seleccionado pertenece al testigo de máxima concentración de la curva de calibrado de AM. El tercer espectro fue elegido por SIMPLISMA entre los espectros de las muestras reales y su forma no pudo relacionarse con el espectro de ninguno de los analitos de interés. El cuarto espectro seleccionado correspondió al testigo de máxima concentración de la curva de calibrado del AO y el



quinto espectro se supone corresponde al de una especie desconocida presente en las muestras reales. Por lo tanto este conjunto de espectros fue utilizado como estimación inicial para comenzar la optimización mediante MCR.



*Figura 5.5. Espectros seleccionados según SIMPLISMA de la matriz Z*

### *III- Optimización mediante Mínimos Cuadrados Alternados*

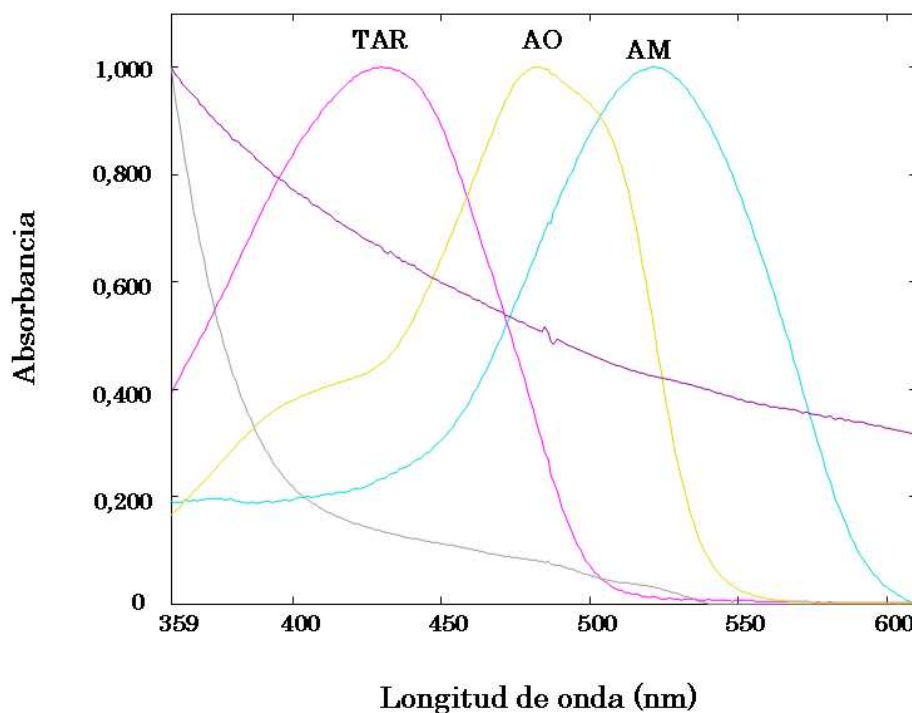
El proceso de iteración incorporó las restricciones mencionadas en la **sección 5.4.3.1**, dando como resultado las siguientes matrices: matriz  $\mathbf{S}^T$  (5x252) que contiene los espectros normalizados recuperados para los tres analitos y para las dos especies desconocidas (**Figura 5.6**). En dicha figura se muestran los espectros de los tres analitos con su máximo de absorción característico para cada uno (AM= 517 nm, AO= 482 nm y TAR= 428 nm) y las dos especies desconocidas. Por otro lado se obtuvo la matriz  $\mathbf{C}$



(100x5) que contiene la concentración de todas las especies que absorben en el rango espectral estudiado para los patrones puros para cada colorante, las mezclas sintéticas, las muestras reales y los materiales de referencia.

Los parámetros utilizados en la evaluación de la calidad de la optimización fueron la falta de ajuste (*lof*, del inglés “*lack of fit*”) y la varianza explicada  $R^2$ , que reporta la varianza recogida por el producto  $CxS^T$ , según las **ecuaciones 5.7. y 5.8.**

El valor para *lof* fue de 8,36 % mientras que la varianza explicada fue de 99,3 %.



**Figura 5.6.** Espectros normalizados recuperados para los tres analitos y para las dos especies desconocidas

#### IV- Curvas de calibrado

Mediante MCR se obtiene un perfil de respuestas que se relaciona con la concentración (a través de la curva de calibrado) y un perfil de respuestas espectrales.

Las ecuaciones de las curvas de calibrado obtenidas fueron:

- ✓ Amaranto,  $Y = (0,0322 \pm 2,7 \cdot 10^{-5}) C + (0,0002 \pm 1,8 \cdot 10^{-4})$ ,
- ✓ Amarillo ocaso,  $Y = (0,0465 \pm 3,7 \cdot 10^{-4}) C + (0,0065 \pm 2,6 \cdot 10^{-3})$ ,
- ✓ Tartrazina,  $Y = (0,0281 \pm 9,1 \cdot 10^{-5}) C + (0,0017 \pm 6,14 \cdot 10^{-4})$ ,

siendo Y el valor obtenido para cada testigo en el perfil de concentraciones y C la concentración en  $\text{mg L}^{-1}$  para cada uno de los analitos estudiados.

*V- Mezclas sintéticas*

Para evaluar el error de predicción del método se llevó a cabo el análisis de mezclas sintéticas (M.S.) mediante MCR-ALS. En la **Tabla 5.3** se muestran los valores de concentración de las cuatro mezclas sintéticas, los obtenidos mediante el análisis y los porcentajes de recuperación.

**Tabla 5.3.** Porcentajes de recuperación en las mezclas sintéticas. Unidades de concentración en  $\text{mg L}^{-1}$  de testigo

M.S.	SINTÉTICA			PREDICHA			% DE RECUPERACIÓN		
	AM	AO	TAR	AM	AO	TAR	AM	AO	TAR
1	5,4	5,6	0	5,52	5,77	0	102,2	103,1	0
2	0	5,6	0	0	5,63	0	0	100,6	0
3	0	5,6	5,4	0	5,75	5,58	0	102,6	103,4
4	0	0	5,4	0	0	5,48	0	0	101,4

Para calcular el error de predicción global del método se utilizó la siguiente expresión:

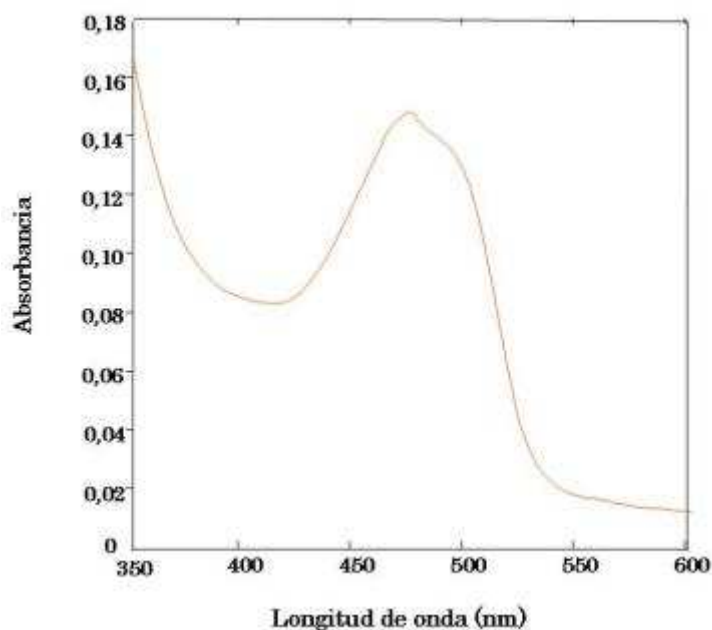
$$\text{Error \%} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{\text{muestra}} (c_i - \hat{c}_i)^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{\text{muestra}} (\hat{c}_i)^2}} \times 100$$

donde  $c_i$  es el valor conocido de la concentración del analito en cada mezcla sintética y  $\hat{c}_i$  es el valor de la concentración calculada por el método propuesto. El valor obtenido del error de predicción fue 2,4 %.

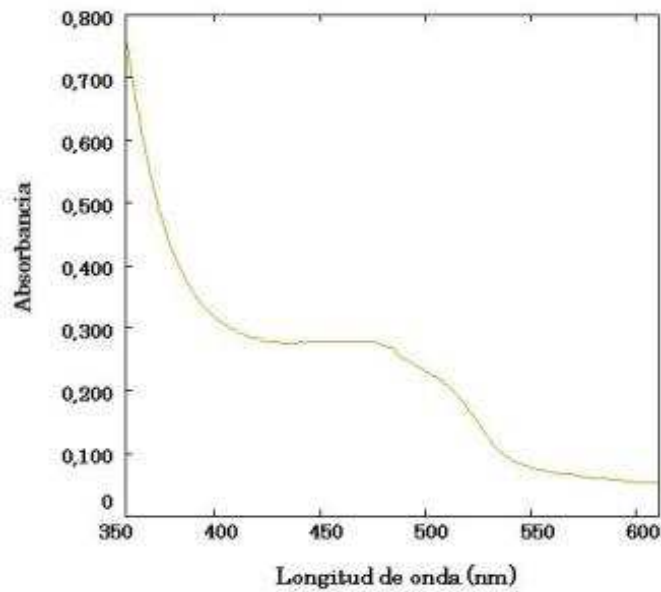
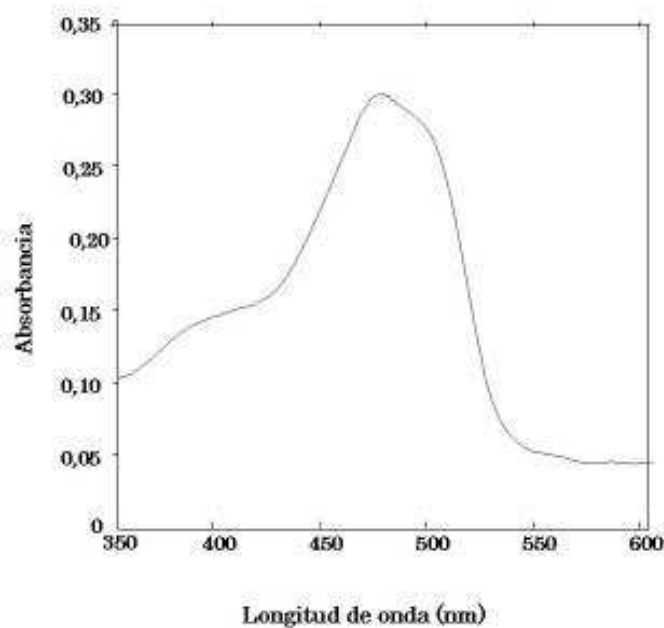
### 5.5.3. Análisis de muestras reales

El método propuesto se aplicó para la determinación simultánea de AM, AO y TAR en las muestras reales descritas en la *sección 5.4.3. I*. En la *Figura 5.7*. se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de absorción de tres de las muestras estudiadas.

*a.*





*b.**c.*

*Figura 5.7. Espectros de absorción de las muestras utilizadas: a. gaseosa, b. agua saborizada, c. bebida hidratante*

En la *Tabla 5.4* se presentan las concentraciones de AM, AO y TAR en las muestras obtenidas por el método propuesto. El Código Alimentario Argentino establece para AM, AO y TAR una concentración máxima permitida en bebidas analcohólicas

gasificadas y no gasificadas de 50; 100 y 100 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente [7]. Sin embargo en el rótulo de las muestras analizadas no se indica la concentración de cada colorante.

**Tabla 5.4.** Concentraciones, en mg L<sup>-1</sup>, de AM, AO y TAR obtenidas por el método propuesto en las muestras reales estudiadas

	CONCENTRACIÓN OBTENIDA		
	AM	AO	TAR
G1	2,06	11,69	0
G2	0	30,18	0
G3	0	29,06	0
G4	16,11	18,51	0
AS1	0	0	8,23
AS2	0	12,06	6,37
AS3	0	9,23	8,73
BH1	19,21	7,41	0
BH2	0	25,37	0
BH3	0	0	5,62

#### 5.5.4. Validación del método propuesto


La validación del método propuesto se realizó de dos maneras diferentes: mediante un estudio de recuperación y empleando materiales de referencia preparados en nuestro laboratorio.

Estudio de recuperación

Para llevar a cabo este estudio se mide un determinado volumen de cada una de las muestras y se adiciona una concentración conocida de los analitos. En la **Tabla 5.5.** se muestran las concentraciones de AM, AO y TAR agregadas a cada una de las muestras, los resultados obtenidos por el método propuesto y los porcentajes de recuperación.

**Tabla 5.5.** Estudio de recuperación para AM, AO y TAR. Unidades de concentración mg L<sup>-1</sup>

	CONCENTRACIÓN								
	AGREGADA			OBTENIDA			% RECUPERACIÓN		
	AM	AO	TAR	AM	AO	TAR	AM	AO	TAR
G1	35,0	17,5	0	35,09	28,40	0	94,4	95,5	0
	67,5	35,0	0	73,01	46,90	0	105,1	100,6	0
G2	0	17,5	0	0	48,98	0	0	107,4	0
	0	35,0	0	0	68,54	0	0	109,6	0
G3	0	17,5	0	0	46,12	0	0	97,5	0
	0	35,0	0	0	66,77	0	0	107,7	0
G4	35,0	17,5	0	50,86	36,17	0	99,3	100,9	0
	67,5	35,0	0	90,41	53,54	0	110,1	100,1	0
AS1	0	0	35,0	0	0	39,84	0	0	90,3
	0	0	67,5	0	0	79,25	0	0	105,2
AS2	0	17,5	35,0	0	28,82	39,37	0	95,8	94,3
	0	35,0	67,5	0	48,69	79,62	0	104,7	108,5
AS3	0	17,5	35,0	0	26,34	45,37	0	97,8	104,7
	0	35,0	67,5	0	45,34	82,64	0	103,2	109,5
BH1	35,0	17,5	0	52,83	24,47	0	96,1	97,5	0
	67,5	35,0	0	88,78	42,81	0	103,1	101,1	0
BH2	0	17,5	0	0	42,01	0	0	95,1	0
	0	35,0	0	0	63,55	0	0	109,1	0
BH3	0	0	35,0	0	0	40,09	0	0	98,5
	0	0	67,5	0	0	76,88	0	0	105,6

  
➤ Validación empleando materiales de referencia

La preparación de los Materiales de Referencia (MR) se realizó en nuestro laboratorio con las muestras comerciales en función de los tres grupos de muestras seleccionadas (gaseosas (G), aguas saborizadas (AS) y bebidas hidratantes (BH)). En todos los casos, la elección de las muestras para sintetizar los MR se llevó a cabo de modo tal que sean representativas del grupo, es decir que contenga todos los componentes de las distintas matrices. Los MR preparados fueron:

- ✓ Material de Referencia MRG: se preparó teniendo en cuenta las gaseosas comerciales las cuales contenían AM y AO. Se midieron cantidades iguales de dos de las muestras, se homogeneizó y filtró con un filtro de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro.
- ✓ Material de Referencia MRGA: se preparó agregando a un volumen conocido de MRG, 5 mg L<sup>-1</sup> de AM y AO.
- ✓ Material de Referencia MRAS: se preparó teniendo en cuenta las aguas saborizadas comerciales las cuales contenían AO y TAR. Se midieron diferentes volúmenes de dos de las muestras, se homogeneizó y filtró con un filtro de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro.
- ✓ Material de Referencia MRASA: se preparó agregando a un volumen conocido de MRAS, 5 mg L<sup>-1</sup> de AO y TAR.
- ✓ Material de Referencia MRBH: se preparó teniendo en cuenta las bebidas hidratantes comerciales las cuales contenían AO y TAR. Se midieron cantidades iguales de dos de las muestras, se homogeneizó y filtró con un filtro de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro.
- ✓ Material de Referencia MRBHA: se preparó agregando a un volumen conocido de MRBH, 5 mg L<sup>-1</sup> de AO y TAR.



La concentración de cada colorante en los MR preparados se realizó empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), ya que es la técnica usualmente utilizada para la determinación de estos analitos. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 5.6**.

**Tabla 5.6.** Concentración de AM, AO y TAR, en  $\text{mg L}^{-1}$  en los materiales de referencia.

MR	HPLC		
	AM	AO	TAR
MRG	0,140	15,61	0
MRGA	5,42	20,03	0
MRAS	0	6,33	2,29
MRASA	0	11,15	7,11
MRBH	0	14,37	0,94
MRBHA	0	19,15	5,96

Posteriormente se analizaron los MR por el método propuesto. En la **Tabla 5.7** se muestran los valores obtenidos y los porcentajes de error relativo.

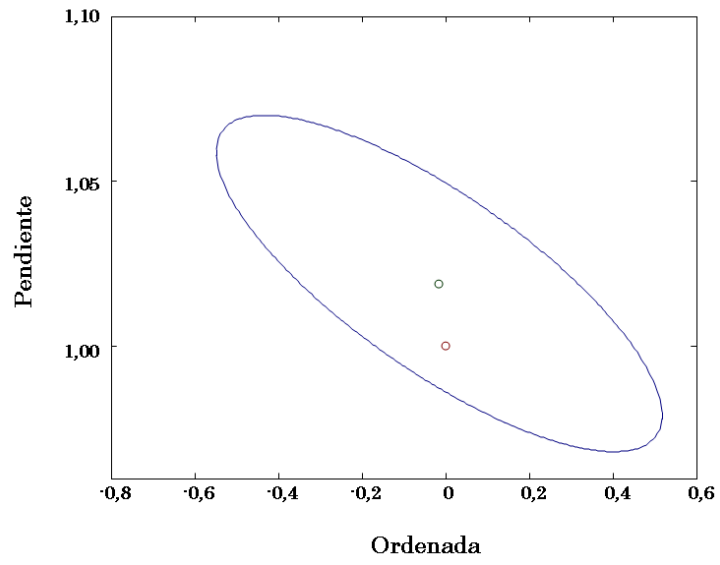
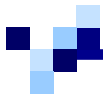
Tabla 5.7. Determinación de AM, AO y TAR en los materiales de referencia por el método propuesto. Unidades de concentración mg L<sup>-1</sup>

MR	MÉTODO PROPUESTO			VALORES DE REFERENCIA			% ERROR RELATIVO*		
	AM	AO	TAR	AM	AO	TAR	AM	AO	TAR
MRG	0,138	15,53	0	0,140	15,61	0	1,43	0,51	0
MRGA	5,79	19,71	0	5,42	20,03	0	-6,82	1,60	0
MRAS	0	6,16	2,24	0	6,33	2,29	0	2,69	2,18
MRASA	0	11,19	6,74	0	11,15	7,11	0	-0,36	5,20
MRBH	0	15,23	0,99	0	14,37	0,94	0	-5,98	-5,32
MRBHA	0	20,19	5,74	0	19,15	5,96	0	-5,43	3,69

\* % Error Relativo= (VMR - VMP)/VMR\*100, VMR: valor de concentración por el método de referencia; VMP: valor de concentración por el método propuesto.

Ambos estudios de validación fueron altamente satisfactorios, teniendo en cuenta la complejidad de las muestras analizadas.

De manera tal de determinar la habilidad predictiva del método, se aplicó un análisis de regresión lineal con los datos de concentración obtenidos por el método propuesto en función de las concentraciones de los materiales de referencia. Los valores de ordenada y pendiente estimados (-0,01; 1,02) fueron comparados con los valores ideales de 0 y 1, utilizando el test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) aplicando ajuste de regresión bilineal (BLR). La **Figura 5.8.** muestra la gráfica de EJCR, obtenida con un 95 % de confianza en la cual, se observa que la elipse contiene el punto teórico, indicando la habilidad predictiva del método propuesto.



*Figura 5.8. Región Elíptica de Confianza Conjunta (EJCR)*



## 5.6. CONCLUSIONES PARCIALES

La aplicación conjunta de espectrometría UV-V acoplada a Resolución Multivariada de Curvas optimizada mediante Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS) como herramienta quimiométrica, permitió determinar amaranto, amarillo ocaso y tartrazina en muestras de matrices complejas, como gaseosas, aguas saborizadas y bebidas hidratantes.

El pretratamiento de las muestras es simplemente una dilución, llevando a volumen a pH apropiado.

La validación del mismo se llevó a cabo realizando un estudio de recuperación y empleando materiales de referencia preparados en nuestro laboratorio. Los porcentajes de recuperación fueron altamente satisfactorios.

El método propuesto puede ser considerado una alternativa rápida para el análisis de control de alimentos, con la utilización de instrumentos simples y de bajo costo.



**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] S. Pereira Alves, D. Mares Brum, E. Castello Branco de Andrade, A. Duarte Pereira Netto, *Food Chemistry*, 107, 489 (2008).
- [2] J. V. Brasó Aznar, G. Jorro Martínez, *Manual de alergia clínica*, Ed. Elsevier, España (2003).
- [3] D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, D. Crumpler, L. Dalen, K. Grimshaw, *The Lancet*, 370, 1560 (2007).
- [4] M. Calvo Rebollar, *Aditivos alimentarios, Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud*, pág. 38, Zaragoza, Mira S.A. (1991).
- [5] M. L. Silva, M. B. Q. García, J. L. F. C. Lima, E. Barrado, *Talanta*, 72, 282 (2007).
- [6] M. Perez-Urquiza, J. L. Beltran, *J. Chrom. A*, 898, 271 (2000).
- [7] Código Alimentario Argentino, Capítulo XII, Anexo IV (actualizado al mes de junio de 2007).
- [8] L. Fan, Y. Zhou, W. Yang, G. Chen, F. Yang, *J. of Hazardous Materials B*, 137, 1182 (2006).
- [9] F. Gosetti, V. Gianotti, S. Polati, M. C. Gennaro, *J. Chrom. A*, 1090, 107 (2005).
- [10] F. Soponar, A. Cătălin Moț, C. Sârbu, *J. Chrom. A*, 1188, 295 (2008).
- [11] H. Ya Huang, Y. Chieh Shih, Y. Chieh Chen, *J. Chrom. A*, 959, 317 (2002).
- [12] L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández, I. de Orbe, R. Avidad, *Talanta*, 47, 861 (1998).
- [13] E. Dinç, E. Baydan, M. Kanbur, F. Onur, *Talanta*, 58, 579 (2002).
- [14] E. C. Vidotti, W. F. Costa, C. C. Oliveira, *Talanta*, 68, 516 (2006).
- [15] M. Pérez-Urquiza, J. L. Beltrá, *J. Chrom. A*, 898, 271 (2000).
- [16] M. Ma, X. Luo, B. Chen, S. Su, S. Yao, *J. Chrom. A*, 1103, 170 (2006).
- [17] N. Yoshioka, K. Ichihashi, *Talanta*, 74, 1408 (2008).
- [18] Y. Ni, X. Gong, *Anal. Chim. Acta* 354, 163 (1997).

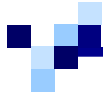


- [19] R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, E. Casassas, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 18, 293 (1993).
- [20] A. Izquierdo-Ridorsa, J. Taurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38, 183 (1997).
- [21] J. Taurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, *Anal. Chem.* 69, 2329 (1997).
- [22] O. S. Borgen, B. R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, 246, 379 (1991).
- [23] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30, 133 (1995).
- [24] M. C. Antunes, J. E. J. Simão, A. C. Duarte, R. Tauler, *Analyst*, 127, 809 (2002).
- [25] B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handling in Science and Technology 20A: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Ed. Elsevier (1998).
- [26] W. Winding, J. Guilment, *Anal. Chem.* 63, 1425 (1991).
- [27] G. H. Golub, Ch. F. Van Loan, *Matrix Computations*, The Jhon Hopkins University Press, Baltimore, (1989).
- [28] C. Mason, M. Maeder, A. Whitson, *Anal. Chem.* 73, 1587 (2001).
- [29] R. Tauler, *J. Chemometrics*, 15, 627 (2001).
- [30] A. de Juan, Y. Vander Hieden, R. Tauler, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 346, 307 (1997).
- [31] H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. Zuberbühler, *Talanta* 12, 1133 (1985).
- [32] The Mathworks, MATLAB®, versión 6.5, Natick, MA, (2002).
- [33] Group of Solution Equilibria, University of Barcelona, MCR Homepage. URL: <http://www.ub.es/gesq/mcr/ndownload.html>.



# *Capítulo 6*

CONCLUSIÓN



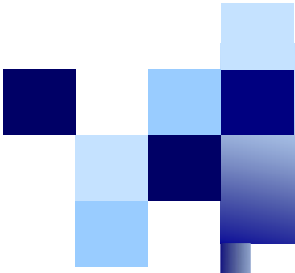
## CONCLUSIÓN

El empleo de aditivos por parte de la industria alimentaria tiene como objetivo fundamental conservar las cualidades nutricionales y la inocuidad de los productos alimenticios a lo largo de la cadena de elaboración y de distribución. Sin embargo, algunos aditivos podrían originar perjuicios para la salud humana mientras que la toxicidad de otros no está debidamente establecida. Por ello, en esta Tesis se desarrollaron los siguientes métodos analíticos que pueden contribuir al control de calidad de alimentos:

1. En el primer trabajo de Tesis se desarrolló un método turbidimétrico aplicando la metodología de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para la determinación de ciclamato en endulzantes de mesa, gaseosas y jugos de fruta, ambos dietéticos. El método propuesto es rápido, de bajo costo, sensible, fácil de implementar y con una alta frecuencia de muestreo. Además, las muestras analizadas no requieren tratamiento previo y la presencia de otros aditivos y edulcorantes que se encuentran en las muestras comerciales no interfieren significativamente. El método propuesto se validó frente al método de referencia AOAC obteniéndose resultados muy satisfactorios.
2. La aplicación conjunta de espectrometría UV acoplada a calibración multivariada (PLS-1) como herramienta quimiométrica permitió determinar sacarina y/o acesulfame-K en muestras de matrices complejas, como endulzantes comerciales (líquidos y sólidos) y jugos de fruta en polvo. El método propuesto puede ser considerado una alternativa rápida para el análisis de control de alimentos, con la utilización de instrumentos simples y de bajo costo, en el cual solo se realiza una dilución con una solución de pH apropiado, como pretratamiento de las muestras. La aplicabilidad del mismo

se probó a través de un estudio de recuperación y los porcentajes de recuperación fueron altamente satisfactorios.

3. Para la determinación de ácido ascórbico y azúcares totales en muestras de jugos de fruta comerciales y naturales, se diseñó un sistema FIA con fotodegradación en línea y detección espectrofotométrica. El sistema FIA es extremadamente simple y muy accesible para los laboratorios de rutina. Además, la lámpara germicida para la fotorreacción es económica y fácil de conectar en línea. Este método podría ser una contribución importante al análisis cuantitativo, para determinar analitos fotorreactivos en muestras de alimentos. Ofrece las ventajas de un análisis rápido, bajo riesgo de contaminación, bajo consume de reactivos y un pretratamiento simple como filtración y dilución. La exactitud fue testeada con un ensayo de recuperación, obteniéndose buenos resultados.
4. El último trabajo de esta Tesis se basó en la determinación de amaranto, amarillo ocaso y tartrazina aplicando espectrometría UV-V acoplada a Resolución Multivariada de Curvas optimizada mediante Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS) como herramienta quimiométrica. Este método se aplicó a muestras de matrices complejas, como gaseosas, aguas saborizadas y bebidas hidratantes y el pretratamiento de las mismas consistió en una dilución y llevando a volumen a pH apropiado. El método fue validado mediante un estudio de recuperación y con materiales de referencia preparados en nuestro laboratorio. Los porcentajes de recuperación fueron altamente satisfactorios. Esta propuesta puede ser considerada una alternativa rápida para el análisis de control de alimentos, con la utilización de instrumentos simples y de bajo costo.



# *Apéndice*





## PRODUCTIVIDAD

Los resultados derivados de este trabajo de Tesis, así como de estudios relacionados con él, han dado origen a la siguiente productividad:

### *Publicaciones en Revistas Científicas*

- ✓ **“Automated turbidimetric determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners without pre-treatment”**

Natalia E. Llamas, María S. Di Nezio, Miriam E. Palomeque, Beatriz S. Fernández Band.

*Analytica Chimica. Acta, 539, 301-304 (2005) Ed. Elsevier.*

- ✓ **“Direct determination of saccharin and acesulfame-k in sweeteners and fruit juices powders”**

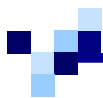
Natalia E. Llamas, María S. Di Nezio, Miriam E. Palomeque, Beatriz S. Fernández Band.

*Food Analytical Methods, 1, 43-48 (2008) Ed. Springer.*

- ✓ **“Flow-injection spectrophotometric determination of ascorbic acid and total sugars in fruit juices using photodegradation on-line”**

Natalia E. Llamas, María S. Di Nezio and Beatriz S. Fernández Band

Enviado para su publicación a *Journal of Food Composition and Analysis, JFCA-D-08-00514, Ed. Elsevier.*



- ✓ **“Amaranth, Sunset Yellow and Tartrazine determination by using UV-Vis measurements and Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS)”**

Natalia E. Llamas, Mariano E. Garrido, María S. Di Nezio, Beatriz S. Fernández Band

En redacción

### ***Presentaciones en Reuniones Científicas Nacionales***

- ✓ **“Método automatizado para la determinación turbidimétrica de ciclamato en edulcorantes y bebidas dietéticas”**

Natalia E. Llamas, María S. Di Nezio, Miriam E. Palomeque, Beatriz S. Fernández Band

II Congreso Argentino de Química Analítica

Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 28-31 de octubre de 2003

- ✓ **“Determinación de sacarina y acesulfame K en presencia de aspartamo en endulzantes y bebidas dietéticas”**

Natalia E. Llamas, María S. Di Nezio, Miriam E. Palomeque, Beatriz S. Fernández Band

III Congreso Argentino de Química Analítica

Villa de Merlo, San Luis, Argentina, 1-4 de noviembre de 2005



✓ **“Método FIA integrado con fotodegradación para la determinación de ácido cítrico y ácido ascórbico en jugos de fruta”**

Natalia E. Llamas, María S. Di Nezio, Miriam E. Palomeque, Beatriz S. Fernández  
Band

II Congreso Iberoamericano y IV Argentino de Química Analítica

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 27-30 de agosto de 2007