



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA ELECTROFORÉTICA DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA PARA EL ANÁLISIS DE EDULCORANTES ARTIFICIALES EN MUESTRAS DE AGUA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN QUÍMICA

PRESENTA:

Q. LORENA CAMARGO MEDRANO

DIRECTOR:

DR. ISRAEL SAMUEL IBARRA ORTEGA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

ENERO, 2019





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Applied Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 14 de enero de 2019

Número de control: ICBI-D/042/2019
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la Q. Lorena Camargo Medrano, alumna de la Maestría en Química con número de cuenta 216772, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "Desarrollo de una técnica electroforética de preconcentración en línea para el análisis de edulcorantes artificiales en muestras de agua", en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dra. María Elena Páez Hernández
SECRETARIO	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
VOCAL	Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega
SUPLENTE	Dra. Eva María Santos López

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

Dr. Óscar Rodolfo Suárez Castillo
 Director del ICBI

ORSC/BMM

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tlaxianguo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo
 México C.P. 42184
 Teléfono: 452 (771) 71 720-00 ext. 2231
 Fax: 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 2 del Área Académica de Química y en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La investigación fue apoyada por el proyecto PRODEP-PTC “Síntesis y aplicación de polímeros molecularmente impresos acoplados a sistemas de separación instrumentales en el análisis de residuos de iones metálicos y pesticidas en muestras de interés ambiental y alimenticio”. Así como por CONACyT con la beca de maestría otorgada al CVU: 828190.

Parte de este trabajo fue presentado en:

XXX Congreso Nacional de Química Analítica (2017) con el trabajo “Desarrollo de un sistema de separación y análisis de edulcorantes artificiales mediante electroforesis capilar”

33° Latin-American Congress of Chemistry (33-CLAQ) y X Congress of Chemical Sciences, Technology and Innovation (QuimiCuba’2018) con el trabajo “Desarrollo de un sistema de separación, análisis y pre-concentración en línea de edulcorantes artificiales mediante electroforesis capilar”

Este trabajo ha sido publicado en el artículo de investigación: Solid-Phase Extraction and Large-Volume Sample Stacking-Capillary Electroforesis for Determination of Artificial Sweeteners in Water Samples. Lorena Camargo Medrano, Juan Francisco Flores-Aguilar, Gabriela Islas, José Antonio Rodríguez, Israel Samuel Ibarra. **Food Analytical Methods** 12, (2019), 526-533.

AGRADECIMIENTOS

Familia, ¡gracias por todo! Por su apoyo incondicional, sus regaños, los viajes y comidas familiares, las tardes viendo películas en casa y los juegos de mesa interminables, que forman parte de los mejores momentos y recuerdos de mi vida. Papi sabes que te amo mucho y que eres un gran ejemplo de hombre, nunca podré agradecer y pagar todo lo que has hecho por mí, pero lo voy a intentar día con día. Mamita, creo que no podríamos ser más diferentes y similares a la vez...gracias por todo lo que me has aguantado y enseñado, te amo con todo mi corazón, no hay nadie que me enseñe más que tú. Pollo, eres y siempre serás el hombre que más amo en el universo, gracias por ser mi hermanito. Mara, sin ti mi vida no sería lo mismo, me encanta encontrar en ti, mi hermanita, a la mejor confidente, amiga, compañera de maratones frente al televisor, pareja de baile y consejera que la vida me pudo regalar, simplemente ¡Te amo!

Ahora quiero agradecer de manera súper especial a mi "jefecito" el Dr. Israel, por todo el apoyo y confianza que ha depositado en mí, espero no haberlo defraudado. Si bien el camino no fue fácil, creo que aprendimos mucho mutuamente y sin duda alguna yo fui la que más aprendió en ese proceso. Hoy puedo decir que no solo concluyo una maestría con el conocimiento que usted me brindó, sino también con una hermosa amistad que espero perdure por muchos años. Gracias por ayudarme a cumplir muchas metas personales y académicas que tenía, en fin...¡gracias por todo!. Le agradezco igualmente a la Dra. Gaby por enseñarme a trabajar mejor en el laboratorio y a ser más ordena. A ustedes dos les doy las gracias por abrirme las puertas de su casa, más que como una alumna, como una amiga.

A los doctores que formaron parte del comité evaluador de esta tesis, Dra. Eva, Dra. Elena y Dr. Pepe: les agradezco por todo el seguimiento de este proyecto dedicando su tiempo y paciencia a enseñarme a pensar como químico. Por ser más allá que asesores, un apoyo siempre que lo he necesitado. Por todos los conocimientos y experiencias compartidas conmigo no sólo en clase, sino también dentro y fuera del laboratorio. De igual manera, les agradezco sus valiosas aportaciones que hicieron de este un mejor trabajo.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios 2 y 1. Miri, (¡mi adorada Puchus!), Lupita Rangel y Tane, las Puchus originales, son grandes amigas para mí, y aunque ya no vamos a estar en el mismo laboratorio espero que nos veamos tan seguido como podamos, ¡las quiero mucho, mucho amigas!. Emma Martínez (¡ahora si te puse! jaja), Giaan, Lupita Aguilar, Juanfi, Emma Escalante, Isaí, Amy y Xochitl: amigos, ustedes también se robaron un pedacito de mi corazón, siempre recordaré las largas conversaciones en el laboratorio o en diferentes establecimientos de comida (jajaja) en donde nos moríamos de risa, espero que me sigan invitando a las reuniones ¡Los quiero!

Gracias a todas aquellas personas (doctores, compañeros y amigos) que hicieron de mi paso por la universidad una experiencia inolvidable. A mis compañeros desde la licenciatura: Abril, Alexia y Poncho, ¡lo logramos amigos, vamos por más!

Adri, Liz y Miri, las quiero a montones, son las mejores amigas que todos quisieran tener, pero yo les gané (jajaja), gracias por cada detalle y palabra de aliento, y sobre todo por escucharme aun cuando ni yo quiero hacerlo, se merecen el cielo. Compita (Esaú) gracias por esos pequeños detalles que hoy hacen que te llame amigo, por estar y apoyarme en momentos difíciles.

Erick y Marce gracias por las largas charlas, la confianza brindada y por abrirme tan cariñosamente las puertas de su casa. Roomie, te quiero mucho y te doy las gracias por compartir conmigo tu espacio. LM, agradezco todo el cariño que me has dado, eres alguien muy especial para mí.

Jorge, sólo tú y yo sabemos lo complicada que ha sido nuestra amistad, y a pesar de los años, las dificultades, y las diferencias entre nosotros aquí seguimos, espero que sea así por el resto de nuestros días. Ya te lo he dicho muchas veces, pero no importa, cada momento y experiencia a tu lado es excepcional, no hay nadie con quien ría tanto como contigo, te amo mucho.

Con amor, para Iván

“...Sufro la inmensa pena de tu extravío,
siento el dolor profundo de tu partida...”

ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE DE FIGURAS	iv
	ÍNDICE DE TABLAS	vi
	RESUMEN	1
1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	CONTAMINANTES EMERGENTES	4
1.1.1	PRODUCTOS FARMACÉUTICOS	6
1.1.2	PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL	7
1.1.3	PLASTIFICANTES	8
1.1.4	PLAGUICIDAS Y PESTICIDAS	9
1.1.5	DISPONIBILIDAD DE ECs EN MEDIOS ACUÁTICOS	10
1.2	EDULCORANTES ARTIFICIALES	13
1.2.1	SACARINA	13
1.2.2	ACESULFAME-K	14
1.2.3	CICLAMATO	15
1.2.4	ASPARTAME	16
	1.2.4.1 FENILALANINA	17
1.3	MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES ARTIFICIALES	19
1.3.1	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	19
	1.3.1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	21
1.3.2	MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS	23
	1.3.2.1 TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS	23
	1.3.2.2 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS	24
1.4	ELECTROFORESIS CAPILAR	25
1.4.1	TÉCNICAS DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA	27
	1.4.1.1 TÉCNICAS ISOTACOFORÉTICAS (<i>tITP</i>)	27

	1.4.1.2 INYECCIÓN DINÁMICA DE pH	29
	1.4.1.3 PRECONCENTRACIÓN POR BARRIDO (<i>SWEEPING</i>)	30
	1.4.1.4 PRECONCENTRACIÓN POR CAMPO AMPLIFICADO	31
	1.4.1.4.1 INYECCIÓN DE MUESTRA POR CAMPO	32
	AMPLIFICADO (FASI)	
	1.4.1.4.2 PRECONCENTRACIÓN POR VOLUMEN DE	32
	MUESTRA (LVSS)	
2	OBJETIVOS	36
	2.1 OBJETIVO GENERAL	37
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	38
	3.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES	39
	3.2 MATERIAL Y EQUIPO	39
	3.3 OPTIMIZACIÓN DE SISTEMA ELECTROFORÉTICO	40
	3.4 CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA EL SISTEMA CE-UV	40
	3.5 CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA EL SISTEMA CE-LVSS	40
	3.6 OBTENCIÓN Y COMPARACIÓN DE PARÁMETROS	40
	ANALÍTICOS CE-UV vs CE-LVSS	
	3.7 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
	4.1 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA ELECTROFORÉTICO	43
	CONVENCIONAL (CE-UV)	
	4.1.1 EFECTO DEL pH EN EL SISTEMA DE SEPARACIÓN	43
	4.1.2 COMPOSICIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE	46
	4.1.3 VOLTAJE DE SEPARACIÓN	48
	4.1.4 EVALUACIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO	49

4.1.5	IDENTIFICACIÓN DE LAS SEÑALES	51
4.2	OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA (CE-LVSS)	52
4.2.1	VOLUMEN DE INYECCIÓN DE MUESTRA	53
4.2.2	TIEMPO Y VOLTAJE DE PRECONCENTRACIÓN	54
4.3	OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LOS SISTEMAS DE CE-UV vs CE-LVSS	56
4.3.1	COMPARACIÓN CE-UV vs CE-LVSS	58
4.4	APLICACIÓN A MUESTRAS DE AGUA	59
4.4.1	RESULTADOS	61
5	CONCLUSIONES	64
6	REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química de la sacarina	14
Figura 2.	Estructura química del acesulfame-K	14
Figura 3.	Estructura química del ciclamato	15
Figura 4.	Estructura química del aspartame	16
Figura 5.	Estructura química de la fenilalanina	17
Figura 6.	Reacción de derivatización del CYC	20
Figura 7.	Esquema del proceso isotacoforético: 1) estado inicial, 2) inicio de la separación por aplicación de voltaje, 3) separación terminada, y electroferograma obtenido por una separación isotacoforética. EP: electrolito principal, ET: electrolito terminal, A, B y C: analitos.	28
Figura 8.	Diagramas de preconcentración en línea de las técnicas: 1) inyección dinámica de pH, representando como E1 y E2 los ES con diferentes valores de pH, 2) preconcentración por <i>sweeping</i> en donde los agentes surfactantes dentro del ES son los que permitirán la preconcentración.	31
Figura 9.	Esquema del mecanismo de preconcentración mediante LVSS. 1) Inyección de la muestra de baja conductividad, 2) aplicación de voltaje negativo para preconcentrar los analitos y eliminar la matriz del capilar, 3) la polaridad del sistema es cambiada a modo normal y 4) los analitos son separados por electroforesis convencional.	33
Figura 10.	DLZP de los edulcorantes de interés: FEN, SAC, CYC, ACE y ASP	44
Figura 11.	Electroferogramas correspondientes a la evaluación de pH. A) ES de fosfatos pH=8, B) ES de boratos pH=9, C) ES de boratos pH=10, D) ES de fosfatos pH=11, E) ES de fosfatos pH=12. 18 kV, λ 215 nm	45
Figura 12.	Electroferogramas obtenidos mediante el uso de ES de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 25 mmol L ⁻¹ ajustados pH 9, a λ =215 nm y 18 kV. A) biftalato de potasio 5 mmol L ⁻¹ , B) ácido pícrico 5 mmol L ⁻¹ y C) benzoato de sodio 5 mmol L ⁻¹ .	46

Figura 13.	Electroferogramas correspondientes a la evaluación de la concentración de benzoato de sodio dentro del ES. A) 0.5 mmol L ⁻¹ , B) 5 mmol L ⁻¹ , C) 10 mmol L ⁻¹ , D) 20 mmol L ⁻¹ . 18 KV, λ = 215 nm.	48
Figura 14.	Electroferogramas obtenidos de una solución de edulcorantes a 50 mg L ⁻¹ a λ =215 nm y A)14 kV, B)16 kV y C) 18 Kv	49
Figura 15.	Electroferogramas obtenidos de la evaluación de distintos estándares internos A) ácido pícrico, B) ácido aspártico y C) biftalato de potasio. 18 kV, λ = 215 nm.	50
Figura 16.	Electroferograma correspondiente al análisis de una solución a 20 mg L ⁻¹ de ácido pícrico (EI), ACE y SAC; 50 mg L ⁻¹ FEN, ASP y CYC. Analizada a 18 kV y λ =215 nm, buffer de boratos (5 mmol L ⁻¹) y benzoato (0.5 mmol L ⁻¹).	51
Figura 17.	Electroferogramas obtenidos de la evaluación de las condiciones de preconcentración: A) 90 s de inyección a 0.5 psi, 120 s y -6.0 kV de <i>stacking</i> , B) 60 s de inyección a 0.5 psi, 120 s y -8.0 kV de <i>stacking</i> , C) 180 s de inyección a 0.5 psi, 60 s y -12.0 kV de <i>stacking</i> . Analizados bajo las condiciones óptimas de separación: ES de boratos (5mM) y benzoato (0.5 mM), a 18 kV y λ =215 nm	55
Figura 18.	Electroferogramas correspondientes al análisis de una solución a 1 mg L ⁻¹ de ácido pícrico (EI), ACS-K y SAC; 5 mg L ⁻¹ FEN, ASP y CYC. Analizada a 18 kV y λ =215 nm, con buffer de boratos (5 mM) y benzoato (0.5 mM) por ambas metodologías.	59
Figura 19.	Diagrama del proceso de limpieza de muestras mediante cartucho de SPE	60
Figura 20.	Electroferogramas correspondientes a dos muestras reales diferentes comparadas con una solución estándar analizada por LVSS, en el caso de la primera (Muestra 4) no fue necesario hacer	61

uso del proceso de limpieza con SPE, mientras que en la segunda (Muestra 2) se realizó la limpieza con SPE. Análisis mediante el sistema CE-LVSS; 1 min inyección durante 60 s, 1 min de stacking a -8 kV, 215 nm, 18 kV.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	ECs más comunes y sus efectos adversos	5
Tabla 2.	ECs comúnmente encontrados en efluentes de agua tratada y aguas superficiales	11
Tabla 3.	Edulcorantes artificiales encontrados en agua subterránea y superficial	18
Tabla 4.	Metodologías desarrolladas para la determinación de edulcorantes artificiales por HPLC	22
Tabla 5.	Métodos electroquímicos para la determinación y/o remoción de edulcorantes artificiales	24
Tabla 6.	Métodos basados en CE para la detección de edulcorantes artificiales	26
Tabla 7.	Parámetros analíticos de los sistemas CE-UV y CE-LVSS	57
Tabla 8.	Factores de enriquecimiento obtenidos	58
Tabla 9.	Resultados en muestras reales	62

RESUMEN

Los edulcorantes artificiales son ampliamente utilizados como aditivos en alimentos, productos farmacéuticos y como alternativa no calórica para el azúcar natural. En consecuencia a su elevado empleo y desecho, edulcorantes como acesulfame-K (ACE), aspartame (ASP), fenilalanina (FEN), sacarina (SAC) y ciclamato (CYC), han sido clasificados como contaminantes emergentes debido a su elevada persistencia en el ecosistema. Estos compuestos han sido reportados como fuentes principales de contaminación de aguas en concentraciones en el orden de mg L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1} , por lo que, al entrar en contacto con animales y seres humanos pueden ocasionar diversos problemas de salud, y en casos extremos, generar tumores cerebrales y/o cáncer.

Debido a la problemática que representan, se han implementado diversas técnicas analíticas que permitan la identificación y determinación de edulcorantes artificiales presentes en muestras complejas en el orden de trazas y ultratrazas. Dentro de estas técnicas de análisis se encuentran las espectrofotométricas, las cromatográficas, y electroquímicas, entre otras. Sin embargo, la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) destaca debido a que presenta alta eficiencia en el sistema de separación, alta resolución, empleando tratamientos sencillos para las muestras, además de ser una técnica económica y ambientalmente amigable que incluso puede permitir la preconcentración en línea de los analitos.

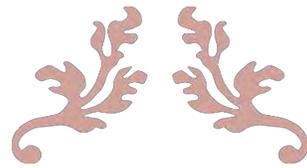
El presente trabajo plantea el desarrollo de una técnica electroforética de preconcentración en línea basada en los principios de *large-volume sample stacking* (LVSS) para la separación y determinación simultánea de edulcorantes artificiales (CE-LVSS). La metodología planteada se optimiza en 3 etapas. La primera incluye la optimización del sistema de detección por electroforesis capilar de zona con detector UV (CE-UV). Posteriormente en una segunda etapa, se evaluaron las variables involucradas en el sistema de preconcentración en línea (CE-LVSS). Finalmente, la tercera etapa consistió en el tratamiento de las muestras mediante el uso de cartuchos de extracción en fase sólida, para la limpieza de las mismas.

Los análisis correspondientes a la evaluación de las variables de preconcentración, se llevaron a cabo bajo las condiciones óptimas de separación CE-UV; electrolito soporte (ES) ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5 mM/



Benzoato de sodio 0.5 mM), a pH 9.0, con voltaje de separación de 18 kV, empleando ácido pícrico como estándar interno, con una longitud de onda de 200 nm. Se obtuvieron como condiciones óptimas de preconcentración: 60 s de inyección a una presión de 0.5 psi, con voltaje de preconcentración de -8 kV durante 60 s, con límites de detección (LOD) que varían en un intervalo de 0.03 a 0.18 mg L⁻¹ y límites de cuantificación (LOQ) de 0.08 a 0.54 mg L⁻¹, con repetitividad y reproducibilidad evaluada a dos niveles de concentración con %DER menor al 10 % en todos los casos, en un intervalo lineal de 0.08 hasta 2.0 mg L⁻¹.

El método desarrollado se empleó para la determinación simultánea de edulcorantes artificiales en muestras de agua potable, aguas de consumo (preenvasada y a granel) y agua de manantial. Los resultados obtenidos indican que el ASP fue el edulcorante encontrado en los 4 tipos de muestra de agua en concentraciones que varían desde 0.19 a 0.76 mg L⁻¹, demostrando que es un contaminante encontrado en medios acuosos, mientras que SAC y ACE sólo fueron encontrados en concentraciones mayores al LOD en una sola muestra de agua preenvasada y agua a granel respectivamente.



INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

El término de contaminantes emergentes (ECs, por sus siglas en inglés) se refiere a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de concentración (Benson et al., 2017).

En años recientes diferentes tipos de compuestos han sido de gran importancia en el ámbito científico por su creciente disponibilidad en el medio ambiente, y han sido considerados como fuentes de contaminación de cualquier medio natural por representar un riesgo a la salud humana, así como a la de diversos organismos vivos (Riva et al., 2018). A pesar de que estos contaminantes son encontrados en niveles de concentración de ng L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$ y mg L^{-1} (Salvatierra-stamp et al., 2018), la mayoría no se encuentran regulados por normativas oficiales alrededor del mundo.

Para la mayoría de los ECs la incidencia, la contribución de riesgo y datos ecotoxicológicos no se encuentran disponibles; por tanto, su uso suele ser de forma indiscriminada. Este tipo de compuestos pueden entrar en contacto al medio ambiente a través de algunas fuentes y vías, como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, efluentes hospitalarios, actividades agrícolas y ganaderas, y tanques sépticos, entre otros. Conforme a la falta de normativas ambientales en diversos países, pueden ser desechados de forma preocupante en diferentes entornos. Es por ello que la Unión Europea (UE) y Estados Unidos de América (USA) han implementado programas normativos para convertir en prioridad la reducción de los ECs en el medio ambiente (Taheran et al., 2018).

Generalmente, las fuentes naturales más contaminadas son los medios acuáticos, (sin embargo, también se han encontrado ECs en suelos y lodos residuales) afectando de manera directa las fuentes de agua potable (Furlong et al., 2016; Benson et al., 2017; Batt et al., 2017; Fischer et al., 2017; Alves et al., 2017). Los ECs representan un grave problema de salud pública cuando las aguas superficiales y subterráneas se utilizan para la generación de aguas potables, ya que las



plantas de tratamiento de aguas no están obligadas ni preparadas para eliminarlos en tan bajas concentraciones (Bai et al., 2018; Riva et al., 2018). Estudios recientes han descrito la presencia de más de 80 compuestos y sus metabolitos en diferentes fuentes de agua, llegando a encontrar algunos de ellos en agua potable o de consumo (Wilkinson et al., 2017; Bai et al., 2018).

Una gran variedad de los contaminantes emergentes se encuentra y deriva de los productos de uso diario como son fármacos, productos de cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales y alimentarios, plastificantes, plaguicidas, hormonas, edulcorantes, entre otros compuestos químicos que alteran las funciones endocrinas. Sin embargo, las plantas tratadoras de agua potable no están preparadas para la eliminación de estos nuevos contaminantes (Siddique et al., 2016, Talib and Randhir 2017, Taheran et al., 2018, Riva et al., 2018). De manera general, la Tabla 1 especifica algunos de las afectaciones al medio ambiente que ocasionan los ECs más comunes.

Tabla 1. ECs más comunes y sus efectos adversos.

Familia ECs	Compuesto químico	Efecto adverso	Referencias
Antibióticos	Penicilina, sulfonamidas y tetraciclinas	Resistencia bacteriana, afectaciones a la estructura de la comunidad bacteriana, alterando la cadena trófica	Witte 1998; Daughton y Ternes 1999
Analgésicos	Diclofenaco	Lesiones renales y alteraciones branquiales de la trucha arcoíris.	Schwaiger et al., 2004
Productos de cuidado personal	Fragancias artificiales	Carcinogénicas a roedores, fácilmente absorbidas por la piel humana alterando el sistema nervioso	Bronaugh et al., 1998 Kirschner 1997
Plastificantes	Bisfenol A (BPA)	Se ha comprobado que tiene efectos estrogénicos en ratas y efectos hormonales que aumentan el riesgo de cáncer de mama en humanos. Actúa como anti-andrógeno y causa efectos secundarios feminizantes en los hombres.	Dodds y Lawson 1938 Krishnan et al., 1993 Sohoni y Sumpter 1998
Desinfectantes	Triclosan	Inhibición del crecimiento de algas	Yang et al. (2008)
Esteroides	Estrona, 17- β estradiol y 17- α etinilestradiol	Feminización en peces	Witte 1998
Edulcorantes artificiales	Ciclamato (CYC); Fenilalanina (FEN)	Compuesto carcinogénico en roedores; daño cerebral	Olney 1998 Murray et al., 2016



1.1.1 PRODUCTOS FARMACEÚTICOS

Los productos farmacéuticos han sido y son ampliamente utilizados tanto para uso humano como uso veterinario. Algunos productos farmacéuticos pueden entrar en contacto con el medio ambiente por excreción de medicamentos no metabolizados, y en la eliminación no adecuada de productos caducados o no utilizados.

De acuerdo con sus propiedades físico-químicas, estas sustancias, así como sus productos de degradación y metabolitos, pueden ser fuentes de contaminación de aguas subterráneas y suelos, que al acumularse afectan al ecosistema y a los seres humanos a través de la cadena trófica. A escala mundial ciertos fármacos legales e ilegales como analgésicos, antihipertensivos, antibióticos, esteroides y beta-bloqueadores, son considerados como los principales ECs (Gogoi et al., 2018).

Dentro de los analgésicos mayormente encontrados en aguas, destacan los antiinflamatorios no esteroideos como ibuprofeno (junto con sus dos metabolitos de degradación: carboxiibuprofeno e hidroxibuprofeno), paracetamol (acetaminofén), naproxeno y diclofenaco, siendo estos últimos de los más utilizados debido a su alta accesibilidad (Guerra et al., 2014; Al Aukidy et al., 2012, Wilkinson et al., 2017).

Otro tipo de fármacos clasificados como contaminantes de aguas son los antibióticos como penicilinas, eritromicina, sulfonamidas, sulfapiridina, trimetoprim, triclosan y tetraciclinas, reportados en diversas muestras de agua, generalmente en concentraciones de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (Focazio et al., 2008; García-Galán et al., 2012; Jiang et al., 2013). Se ha demostrado que pueden ocasionar resistencia microbiana, problemas gastrointestinales, alergias y hasta causar en algunos casos la muerte (Benson et al., 2017; Baquero et al., 2008).



1.1.2 PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL

De manera similar, los productos de cuidado personal (PCPs) han sido catalogados como contaminantes emergentes. Esta clase de productos de uso cotidiano incluyen cosméticos, fragancias, filtros ultravioletas (UV), detergentes y jabones, lociones, repelentes, desodorantes, shampoos, esteroides, hormonas y productos de limpieza personal (Wilkinson et al., 2017; Gogoi et al., 2018). Los PCPs llegan a los medios acuáticos debido a su alto consumo y desecho, al igual que la mayoría de los contaminantes emergentes; sin embargo, no es el único ambiente natural que contaminan, ya que los compuestos lipofílicos que contienen suelen ser absorbidos por materiales sólidos como son los lodos naturales. Estos compuestos al igual que la mayoría de los ECs representan un alto riesgo no solo como contaminantes, sino también como disruptores endocrinos en los seres vivos (Gago-Ferrero et al., 2011; Subedi et al., 2014; Gogoi et al., 2018).

Los filtros UV representan un grupo de PCPs más comúnmente encontrado como contaminantes en ambientes acuáticos (Gogoi et al., 2018). Dentro de los filtros UV más persistentes en medios acuáticos, destacan la 4-benzofenona (BP-4 por sus siglas en inglés) y el ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico (PBSA); llegando a encontrarse en muestras de agua superficial, en influentes y efluentes de plantas tratadoras de agua y en algunos casos incluso en muestras de agua potable y de consumo, en concentraciones variables de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (Giokas et al., 2007; Rodil et al., 2008 y 2012; Gago-Ferrero et al., 2011, Tsui et al., 2014; Subedi et al., 2015; Bai et al., 2018).

Debido a que la mayoría de los PCPs son utilizados y preparados para limpieza personal o del hogar, tienden a contener agentes surfactantes y emulsificantes, representando otro grupo de alta relevancia dentro de los contaminantes emergentes. Los agentes surfactantes generalmente derivan de los alquilfenoles (AP), como los etoxilatos de alquilfenol (APEs) que en su mayoría (90%) son etoxilatos de nonilfenol (NPEOs) y que han sido encontrados en aguas superficiales (Wilkinson et al., 2017). Se estima que aproximadamente el 60% del total de APEs producidos termina contaminando medios acuáticos.



1.1.3 PLASTIFICANTES

Los plastificantes son compuestos que incrementan algunas propiedades de los materiales, como la flexibilidad y maleabilidad, están involucrados en los procesos de producción de plásticos, resinas epóxicas, materiales de curación, contenedores plásticos de alimentos, selladores dentales, botellas, teléfonos celulares entre otros (Wilkinson et al., 2017; Barraza 2013).

Los ftalatos representan el 80 % de los compuestos mayormente utilizados como plastificantes, son compuestos cuyas características físico-químicas ha permitido su amplio uso, aumentando la flexibilidad de los polímeros, se utiliza principalmente el PET (tereftalato de polietileno). Desde su implementación en el mercado, han representado un amplio objeto de estudio, ya que presentan elevada persistencia en el ambiente, con alta resistencia a la degradación química o enzimática y tendencia a bioacumularse en tejidos adiposos (Kubwabo et al., 2013; Siddique et al., 2016). Algunos autores y estudios han reportado que los ftalatos, así como sus metabolitos; tienen alto potencial carcinogénico, derivado de sus estructuras aromáticas, adicionado a diversos efectos tóxicos que incluyen problemas de reproducción, crecimiento y hormonales (Zacharewski et al., 1998; Moore, 2000; Kim et al., 2004; Kang et al., 2005; Chou et al., 2009; Hsieh et al., 2012; Chen et al., 2014).

Otro tipo de compuestos con características aromáticas utilizados como agentes plastificantes son el bisfenol-A (BPA), bisfenol-S (BPS), bisfenol-F (BPF), y el cloruro de polivinilo (PVC) que es de los más utilizados (Wilkinson et al., 2017; Siddique et al., 2016). El BPA es el bisfenol más utilizado a escala mundial, y por lo tanto más estudiado. Catalogado por diferentes autores como un disruptor endocrino con propiedades carcinogénicas, el BPA forma parte de los ECs que actualmente se encuentran en medios acuáticos en concentraciones variables y generalmente en el orden de ng L^{-1} y/o $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que, para compuestos como el BPS BPF y los ftalatos, a pesar de ser compuestos de gran interés científico, sus efectos ecotoxicológicos y tóxicos no han sido reportados (Grignard et al., 2012; Lakind et al., 2012; Siddique et al., 2016; Wilkinson et al., 2017).



1.1.4 PLAGACIDAS Y PESTICIDAS

Dentro de los contaminantes de mayor importancia se encuentran los pesticidas, que junto con sus productos de degradación (metabolitos) son capaces de producir efectos adversos en el medio ambiente y a la salud, como cáncer hepático y defectos congénitos en personas y animales (Batt et al., 2017; Fischer et al., 2017; Bai et al., 2018).

El uso generalizado de pesticidas y plaguicidas en actividades antropogénicas como agricultura, paisajismo, horticultura, mantenimiento de diversas áreas recreativas como campos de golf y otros servicios, dan como resultado el transporte de estos contaminantes desde la superficie terrestre a las aguas superficiales y subterráneas a través de la escorrentía.

Algunos de los pesticidas más frecuentemente detectados son el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), con propiedades herbicidas, que se ha encontrado en concentraciones variables entre ng L^{-1} y mg L^{-1} . Así mismo se ha reportado la presencia de otros herbicidas como bromacil, atrazina, diuron y triclopir en muestras de agua, mientras que dentro de los insecticidas encontrados en muestras de agua destacan el carbaril y la imidacloprid también en concentraciones variables. En general, se ha encontrado que, los pesticidas son menos abundantes que los productos farmacéuticos y otros contaminantes orgánicos que se encuentran en las muestras de agua (Bai et al., 2018). Sin embargo y debido a la regulación que existe para la mayoría de estos compuestos, algunos autores consideran que ya no deberían ser catalogados como contaminantes emergentes (Wilkinson et al., 2017; Gogoi et al., 2018).



1.1.5 DISPONIBILIDAD DE ECs EN MEDIOS ACUÁTICOS

De manera general la Tabla 2 describe los ECs más encontrados en efluentes y aguas superficiales. Con base en la información bibliográfica se han empleado diversas metodologías analíticas en la detección y determinación de los mismos, en las cuales se han incluido técnicas electroquímicas (Lin et al., 2017), espectrofotométricas (Bergheim et al., 2014), de electroforesis capilar (CE) (Yang et al., 2015), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) (Salvatierra-stamp et al., 2018), cromatografía de gases (GC) (Barriada-Pereira et al., 2010), y su acoplamiento a espectrometría de masas (MS) (Barbosa et al., 2016). Que conforme a la complejidad de cada matriz analítica puede requerir de diferentes tratamientos de muestra (Salvatierra-stamp et al., 2018). Algunos de estos involucran extracciones líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) (Hashemi et al., 2017), extracción o microextracción en fase sólida (SPE o SPME respectivamente) (Núñez et al., 2017; Rutkowska et al., 2017), y microextracción en fase líquida (LPME) (Farajzadeh et al., 2016; Núñez et al., 2017), entre otros.



Tabla 2. ECs comúnmente encontrados en efluentes de agua tratada y aguas superficiales.

Clasificación del contaminante	Contaminante	Superficial ^a (ng L ⁻¹)	Efluente ^b (ng L ⁻¹)	Referencias ^{a,b}
Analgésicos	Ibuprofeno	1-2370	<LOD-14600	Petrie et al., 2015 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b ; Tran et al., 2018 ^b
	Diclofenaco	<0.5-253	<LOD-5164	Petrie et al., 2015 ^a ; Wilkinson et al., 2017 ^a ; Jelić et al., 2011 ^b ; Castiglioni et al., 2018 ^b ; Tran et al., 2018 ^b
	Paracetamol	110-1000	<LOD-62000	Kolpin et al., 2002 ^a ; Boyd et al., 2004 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b
	Naproxeno	<1-81	<LOD-3500	Li, 2014 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b ; Tran et al., 2018 ^b
Desinfectante	Triclosan	140-2300	1.3-2500	Kolpin et al., 2002 ^a ; Boyd et al., 2004 ^a ; Jelić et al., 2011 ^b ; Castiglioni et al., 2018 ^b
Antibióticos	Amoxicilina	<2.5-245	<LOQ-1670	Petrie et al., 2015 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b
	Trimetoprim	<1-2	<LOQ-37000	Van Stempvoort et al., 2013 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b
	Sulfametoxazol	<1-46	<LOQ-1800	Van Stempvoort et al., 2013 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b ; Tran et al., 2018 ^b
Antidepresivos	Amitriptilina	66-207	-	Pietre et al., 2015 ^a
	Fluoxetina	5.8-120	-	Petrie et al., 2015 ^a ; Kolpin et al., 2002 ^a
Antineoplásicos	Ifosfamida	0.05-0.14	-	Buerge et al., 2006 ^a
	Ciclofosfamida	0.05-0.17	LOQ-10	Buerge et al., 2006 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b ; Tran et al., 2018 ^b

	Tamoxifen	<0.05-25	<LOQ	Castiglioni et al., 2018 ^b
Hormonas y esteroides	17 α -etinilestradiol	<0.98-10.2	<LOQ-106	Wilkinson et al., 2017 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b
	17 β -estradiol	0.1-200	LOQ-19.45	Petrie et al., 2015 ^a ; Kolpin et al., 2002 ^a ; Castiglioni et al., 2018 ^b ; Tran et al., 2018 ^b
	Coprostanol	<1-2717	-	Peng et al., 2008 ^a
Perfluoroalquilos	Ácido perfluorononanoico	0.03-209	-	Llorca et al., 2012 ^a ; Wilkinson et al., 2017 ^a
	Ácido perfluorooctanoico	0.16-189	-	Llorca et al., 2012 ^a ; Wilkinson et al., 2017 ^a
	Ácido perfluoro-2-propoxipropanoico	<1-630	-	Llorca et al., 2012 ^a ; Wilkinson et al., 2017 ^a
Filtros ultravioleta (UV)	Benzofenona-4	<1-600	-	Rodil et al., 2012 ^a
	Ácido-2-fenilbencimidazol-5-sulfúrico	<1-20	-	Rodil et al., 2012 ^a
Alquilfenoles	4-nonilfenol	165.8-1187.6	-	Wang and Xu, 2012 ^a
	4- <i>t</i> -octilfenol	2.4-14.5	-	Wang and Xu, 2012 ^a
	Linalool	<0.5-0.6	-	Relič et al., 2017 ^a
Fragancias artificiales	Isobornil acetato	<0.18-0.65	-	Relič et al., 2017 ^a
	Aroflorano	<0.17-0.48	-	Relič et al., 2017 ^a
	Bisfenol-A	140-120000	4.8-1840	Petrie et al., 2015 ^a ; Kolpin et al., 2002 ^a ; Boyd et al., 2004 ^a ; Loraine y Pettigrove 2006 ^b ; Terzic et al., 2008 ^b .
Plastificantes	Bisfenol-S	<1.02-306	-	Wilkinson et al., 2017 ^a
	Bisfenol-F	<1-1110	-	Yang et al., 2014 ^a
	Bisfenol-AF	<1-246	-	Yang et al., 2014 ^a
	Dietilftalato	200-420	-	Kolpin et al., 2002 ^a ; Boyd et al., 2004 ^a

1.2 EDULCORANTES ARTIFICIALES

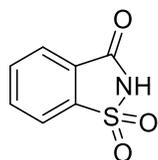
Otro tipo de contaminante reportado en altas concentraciones en fuentes de agua, son los edulcorantes artificiales, como acesulfame-K, sacarina y ciclamato (Frazier et al., 2000, Lange et al., 2012). Este tipo de compuestos son de suma importancia debido al amplio uso que tienen en la actualidad como sustitutos del azúcar natural, evitando así afectaciones a la salud principalmente en personas diabéticas. Adicionalmente son utilizados como aditivos en diversos productos de uso cotidiano como algunos productos farmacéuticos, alimentos y bebidas endulzadas y/o bajos en calorías, en cigarrillos, cosméticos y en productos de cuidado personal como pastas dentales y enjuagues bucales, ya que no son metabolizados por la microflora bucal y, por lo tanto, no provocan caries (Zygler et al., 2010; Vistuba et al., 2015, Núñez et al., 2017). Generalmente los edulcorantes artificiales tienen mayor potencial endulzante que los azúcares naturales, aunque para generar un mejor sabor y características organolépticas idóneas suelen ser utilizados en mezcla. Debido a que los edulcorantes artificiales pertenecen a diferentes familias estructurales, cada uno de ellos posee distintas propiedades físico-químicas.

1.2.1 SACARINA

La Sacarina es el primer compuesto orgánico comercializado como edulcorante con potencial endulzante 300 veces mayor que la sacarosa, descubierto en 1879 (Mooradian et al., 2017). Comercialmente se encuentra en forma de sales de sodio y/o calcio ambas de color blanco e inodoras, ya que en forma de sales es cuando posee alta solubilidad en agua. Generalmente la sacarina de sodio ($C_7H_4NO_3SNa \cdot 2H_2O$) es la sal más utilizada, con un peso molecular de $241.20 \text{ g mol}^{-1}$, punto de fusión cercano a $300 \text{ }^\circ\text{C}$, solubilidad de 1200 g L^{-1} y una constante de acidez de 1.60 (Figura 1). Este compuesto posee alta estabilidad, sus productos de degradación son dependientes del pH y se producen en concentraciones traza, pasando así a ser poco relevantes. Industrialmente es utilizada como endulzante de mesa, y requiere que sea en mezclas con ASP y CYC. De acuerdo a diversas instituciones como la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés), la organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) se han establecido límites para la ingesta diaria aceptada (IDA) para



cada edulcorante, siendo 5 mg Kg^{-1} el IDA de la SAC. (IFIC, 2009; Zygler et al. 2010; Bergamo et al., 2011).



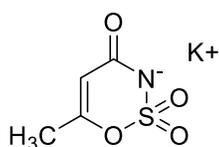
Sacarina (SAC)

$\text{pKa}_1=1.60$

Figura 1. Estructura química de la sacarina

1.2.2 ACESULFAME-K

El acesulfame-K (ACE) o acesulfame potásico fue descubierto accidentalmente en 1967; hoy en día es uno de los edulcorantes más importantes y más utilizados a nivel industrial ya que en 2003 la FDA aprobó su uso como edulcorante general (Mooradian et al., 2017). Se trata de un compuesto no higroscópico que forma cristales desde incoloros a blancos. Con fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNO}_4\text{S}$, el ACE posee un peso molecular de $163.15 \text{ g mol}^{-1}$, punto de fusión menor a 200°C y una constante de acidez de 2.0 (Zygler et al., 2010) (Figura 2).



Acesulfame-K (ACE)

$\text{pKa}_1=2.00$

Figura 2. Estructura química del acesulfame-K

Este edulcorante artificial tiene aproximadamente 200 veces más dulzor que la sacarosa, es altamente soluble en agua y en soluciones alcohólicas-acuosas con mayor contenido de agua,



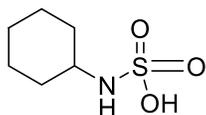
presentando gran estabilidad y un IDA de 15 mg Kg⁻¹ (IFIC, 2009; Bergamo et al., 2011; Lange et al., 2012).

1.2.3 CICLAMATO

El ciclamato de sodio (CYC) o la sal monosódica del ácido ciclohexil sulfamídico es un edulcorante artificial que es aproximadamente 35 veces más dulce que la sacarosa. Fue descubierto en 1937 y es ampliamente utilizado en alimentos y bebidas bajas en calorías. Con fórmula molecular C₆H₁₂NHO₃S posee un peso molecular de 201.22 g mol⁻¹, un punto de fusión mayor a 300 °C, buena solubilidad y estabilidad en agua, y una constante de acidez de 1.90 (Figura 3) (Zygler et al., 2010; Mooradian et al., 2017).

El CYC es un edulcorante controversial ya que en determinadas partes del mundo su uso es restringido o prohibido, como en Estados Unidos de América (USA) donde en 1969 fue prohibido por la FDA, debido a diversos estudios que indicaban que se trataba de un producto con alta actividad carcinogénica, sin embargo, actualmente está aprobado para su uso en más de 50 países, incluyendo México. Para este edulcorante el IDA está establecido en un intervalo de 7-11 mg Kg⁻¹ (IFIC, 2009; Hashemi et al., 2011; Mooradian et al., 2017).

El análisis de este edulcorante por métodos espectrofotométricos generalmente se ve limitado, ya que al no poseer ningún grupo cromóforo dentro de su estructura se dificulta su detección de manera directa. Por ello generalmente se recurre al uso de técnicas de detección indirecta para el mismo (Oliveira et al., 2013; Vistuba et al., 2015), así como a procesos de derivatización (Hashemi et al., 2011).



Ciclamato (CYC)

pK_{a1}=1.90

Figura 3. Estructura química del ciclamato



1.2.4 ASPARTAME

El aspartame (ASP) es un edulcorante intenso que en las décadas de los 80's y 90's tuvo gran éxito comercial al ser el reemplazo del azúcar natural. Descubierta en 1965, se trata de un polvo blanco con fórmula molecular $C_{14}H_{18}N_2O_5$ y peso molecular de $294.31 \text{ g mol}^{-1}$, debido a su estructura química, presenta dos constantes de acidez, la primera en 3.19 y la segunda en 7.87 (Figura 4). Esta molécula presenta baja solubilidad en agua, es por ello que a nivel industrial se mezcla con ACE para incrementar la solubilidad en agua.

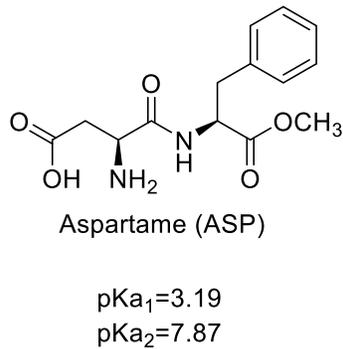


Figura 4. Estructura química del aspartame

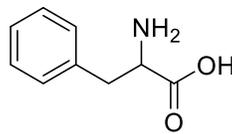
Este compuesto consiste en la unión química de dos aminoácidos, la fenilalanina y el aspartato; puede hidrolizarse lentamente a valores de pH ácidos, produciendo aspartil-fenilalanina y metanol. En una ruta alternativa podría producir diceto-piperazina con eliminación de metanol y, posteriormente, esta transformación conlleva a la hidrólisis de la molécula y la formación de ácido aspártico y fenilalanina. La estabilidad del ASP disminuye conforme aumenta la temperatura (Mooradian et al., 2017).

Para este compuesto que es aproximadamente 180 veces más dulce que la sacarosa, se tiene un IDA de 50 mg Kg^{-1} (IFIC, 2009; Hashemi et al., 2011).



1.2.4.1 FENILALANINA

La fenilalanina es un aminoácido aromático con fórmula molecular $C_9H_{11}NO_2$, y peso molecular $165.19 \text{ g mol}^{-1}$. Debido a que es un metabolito del ASP, se puede encontrar en diferentes muestras endulzadas, y es importante considerarlo dentro de los análisis de las mismas ya que puede generar diversas afectaciones a la salud. Por su estructura química, presenta dos constantes de acidez, la primera en 2.20 debida al grupo del ácido carboxílico y la segunda en 9.01 por la protonación del grupo amino (Figura 5). Se ha estudiado la reactividad de este compuesto, encontrado que es altamente reactivo con radicales hidroxilos (Ludwig et al., 2018).



Fenilalanina (FEN)

$pK_{a1}=2.20$

$pK_{a2}=9.01$

Figura 5. Estructura química de la fenilalanina

1.2.5 EFECTOS ADVERSOS DE LOS EDULCORANTES ARTIFICIALES

Con base a su amplio uso debido a las ventajas que ofrecen los edulcorantes artificiales, se ha permitido su uso en diversos países, siendo el acesulfame-K (ACE), ciclamato (CYC), aspartame (ASP), fenilalanina (FEN), sacarina (SAC), sucralosa (SUC) y neohesperidin (NEO) algunos de los edulcorantes artificiales aprobados por la Unión Europea (EU) (Arbeláez et al., 2015).

Sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos puede generar efectos adversos en la salud del consumidor. Estudios como el de Olney (1998), propone que los edulcorantes artificiales pueden causar tumores cerebrales, mientras que Murray y colaboradores (2016) describen cómo los edulcorantes artificiales pueden alterar las funciones cerebrales que controlan distintos sistemas reguladores. Otros autores han mencionado diversos efectos adversos a la salud humana como son problemas dermatológicos, dolores de cabeza, pérdida de la memoria,



variaciones de humor, alteraciones en la microbiota humana y efectos carcinogénicos, derivados del consumo excesivo de edulcorantes artificiales (Tran et al. 2014; Yang et al. 2015; Murray et al. 2016; Roca-Saavedra et al. 2018).

Por otra parte, el consumo y por ende desecho de los edulcorantes artificiales genera contaminación de sistemas acuíferos, ya que no son metabolizados por el cuerpo humano. En años recientes diversos autores han estudiado los edulcorantes artificiales demostrando que son compuestos extremadamente solubles y persistentes en medios acuáticos, sin embargo, no hay información que establezca los efectos ecotoxicológicos que genere la presencia de estos compuestos en el medio ambiente (Fischer et al., 2017; Batt et al., 2017; Tran et al., 2018).

Debido a que fue recientemente que los catalogaron como contaminantes emergentes, las plantas para el tratamiento de aguas residuales y aguas potables no están preparadas para la eliminación de los mismos, llegando así a encontrarse en diversas muestras de agua como aguas residuales, aguas potables, mantos acuíferos y aguas preenvasadas o embotelladas (Tran et al., 2014; Yang et al., 2017). La Tabla 3 muestra el intervalo de concentraciones de edulcorantes encontradas en agua superficial y subterránea por Tran y colaboradores en 2014.

Tabla 3. Edulcorantes artificiales encontrados en agua subterránea y superficial.

Edulcorante artificial	Agua subterránea (ng L⁻¹)	Agua superficial (ng L⁻¹)
ACE	<3.5- 780	<3.5
ASP	<10	<10
CYC	<4-1640	<4-25
SAC	<3-3210	<3

Con base a la problemática e importancia que este tipo de compuestos representan, se han desarrollado diversas técnicas analíticas que permiten la identificación y determinación de estos compuestos en muestras complejas, entre las cuales se encuentran las técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Zygler et al. 2009; Ordoñez et al. 2013; Salas et al. 2015) y cromatografía de gases (GC) (Arbeláez et al., 2015). Dentro de las técnicas no cromatográficas para el análisis de estos compuestos, se encuentran los métodos



espectroscópicos (Ni et al. 2009), métodos electroquímicos (Lin et al., 2017) y la electroforesis capilar (CE) (Frazier et al., 2000; Bergamo et al., 2011; Stojkovic et al., 2013; Yang et al., 2018), esta última altamente utilizada por su alta eficiencia en el sistema de separación, resolución en los análisis, automatización, tratamientos sencillos, y adicionalmente por ser una técnica económica y ambientalmente amigable (Chen et al., 2012).

Debido a que estos contaminantes se encuentran en concentraciones en el orden de mg L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$ se han implementado diversas técnicas de preconcentración como extracción en fase sólida (SPE) (Zygler et al., 2010; Salas et al., 2015; Yang et al., 2018) y extracción líquido-líquido (LLE) (Ordoñez et al., 2013; Núñez et al., 2017) para su análisis por técnicas instrumentales.

1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES ARTIFICIALES

1.3.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

En 1906, el botánico ruso M. Tswett definió la cromatografía como el método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente dentro de un sistema fluyente; esto en base a la afinidad que presenten los componentes de dicha mezcla hacia las fases móvil y estacionaria (Técnicas Cromatográficas, 2007).

El proceso consiste principalmente en el intercambio de un determinado analito de una fase a otra mientras una se mantiene fija (fase estacionaria) y la otra se mueve a través de ella (fase móvil). La fase móvil es un líquido o un gas, mientras que la fase estacionaria es normalmente un líquido viscoso enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas empaquetadas dentro de una columna (Harris, 2010). Los métodos cromatográficos son usados principalmente para identificar, analizar o separar algún analito presente en una matriz.

Dentro de los métodos cromatográficos más utilizados a nivel mundial, se encuentra la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés), ya que es una herramienta ampliamente utilizada en el ámbito analítico para ECs.



Sin embargo, no suele ser utilizada para el análisis de edulcorantes artificiales debido a la baja volatilidad de estos compuestos. Para poder analizarlos mediante ésta técnica deben primero ser transformados en compuestos de alta volatilidad mediante algún proceso de derivatización, adicionando así pasos extra en el pretratamiento de la muestra (Zygler et al., 2009). Para realizar la derivatización de los edulcorantes se han desarrollado diferentes metodologías como la reportada por Hashemi y colaboradores (2011) para la determinación de CYC, en donde este compuesto se hace reaccionar con nitrito para generar el 1,2-ciclohexeno.

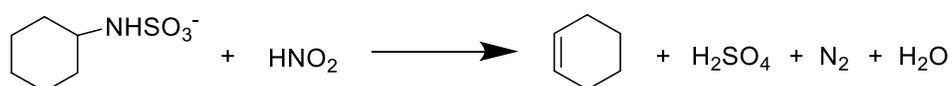


Figura 6. Reacción de derivatización del CYC.

Una de las principales desventajas de este tipo de reacciones para el análisis de edulcorantes artificiales es que además de incrementar el tiempo de tratamiento de muestras, se incrementa el uso y desecho de solventes orgánicos.

1.3.1.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Estudios recientes han demostrado que la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), es una técnica de separación versátil en el análisis de distintos analitos como pesticidas, toxinas, residuos de medicinas veterinarias, contaminantes obtenidos durante el procesado de ciertos alimentos, agua, suelos, alimentos y medicamentos, entre otros. El acoplamiento de HPLC con espectrometría de masas (HPLC-MS) da como resultado una poderosa herramienta debido a su alta sensibilidad y selectividad (Hird et al., 2014).

En el análisis de edulcorantes artificiales ya sea de forma individual como en mezclas, uno de los métodos analíticos mayormente utilizado es la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía iónica, ambas técnicas acopladas a diferentes detectores, siendo el ultravioleta el más utilizado. Una de las grandes ventajas que ofrece la cromatografía líquida para el análisis de este tipo de compuestos, es que en su mayoría son altamente solubles en agua, generando un fácil tratamiento de las muestras, que en ocasiones y dependiendo de la matriz como en el caso de las muestras alimenticias, sólo requiere un paso de dilución (Di Prieta et al., 1990; Morales et al., 2001; Ordoñez et al., 2013; Núñez et al., 2017).

La Tabla 4 muestra algunos de los métodos desarrollados para la determinación de edulcorantes en diferente clase de muestras. De manera general se observa que se utilizan diferentes soluciones tampón con el objetivo de fijar un pH de trabajo, y que las separaciones se llevan a cabo en su mayoría en fase reversa. Se encontraron límites de detección (LOD) variables entre ng L^{-1} y mg L^{-1} , en donde los LOD más pequeños (ng L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$) se obtuvieron mediante el uso de espectrometría de masas.



Tabla 4. Metodologías desarrolladas para la determinación de edulcorantes artificiales por HPLC.

Analito	Muestra	Fase móvil	Columna	Detector	LOD	Referencia
Ácidos orgánicos y edulcorantes	Refrescos	Solución acuosa ácido sulfúrico (pH 1.8) al 5 % acetonitrilo	Aminex HPX87-H (300 x 7.8 mm)	UV (214 nm)	0.03-850 mg L ⁻¹	Morales et al., 2001
ACE, SAC, ASP, ác. Benzoico y sórbico, cafeína, teobromina y teofilina	Preparaciones Farmacéuticas y alimenticias	Isocrática con fosfato diácido de sodio (pH 8.2)-acetonitrilo	Shimpack ICA3 (5 µm, 150 x 4.6 mm)	UV (205, 227 nm)	4-30 mg L ⁻¹	Chen y Wang 2001
ACE, SAC, CYC y ASP	Alimentos y bebidas	Hidróxido de sodio	Dionex AS11 (250 x 2 mm)	Conductividad	0.019-0.89 mg L ⁻¹	Zhu et al., 2005
ACE, ASP, ác. Benzoico, ác. Sórbico, amarillo ocazo y tartrazina	Refrescos	Gradiente metanol: fosfatos (pH 4.0) 5:95	C ₁₈ (10 µm, 250 x 4.6 mm)	UV (235 y 210 nm)	0.1-3.0 mg L ⁻¹	Dossi et al., 2006
ACE, SAC, CYC, ASP, SUC, dulcina, alitamo, neotamo, neohesperidina, dihidrochalcona	Alimentos	Gradiente de trietilamina, ácido fórmico, metanol y acetona.	C ₁₈ Nucleodur C18 Pyramid (5 µm, 250 x 3 mm)	Detector evaporative de luz dispersa	15.0 mg Kg ⁻¹	Wasik et al., 2007
ACE, SAC, CYC, ASP, SUC; alitamo, neotamo y esteviosidos	Alimentos	Gradiente de formiato, metanol y acetonitrilo	C ₁₈ (5 µm, 250 x 4.5 mm)	ESI-MS	<0.10 µg mL ⁻¹	Yang y Chen 2009
ACE, ASP, CYC, SAC, SUC y neohesperidina	Aguas	Gradiente de agua, metanol y acetato de amonio	Luna C ₁₈ (100 x 2 mm) Luna HILIC (100 x 2 mm)	ESI-MS/MS	0.006-8.3 µg L ⁻¹	Ordóñez et al., 2012
ACE, ASP, CYC, SUC Y neohesperidina	Agua residual y de río	Gradiente agua acidificada (pH 2.5) acetonitrilo	Ascentis Express RP-amide (100 mm x 2.1 mm)	ESI-MS/MS	0.001-0.04 µg L ⁻¹	Arbeláez et al., 2015
ACE, ASP, CYC, SAC, SUC, neotame, alitame, neohesperidina y estevioside	Peces	Gradiente agua acidificada (pH 2.5) acetonitrilo	Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (150 x 4.6 mm)	ESI-MS	2.5-125 ng g ⁻¹	Núñez et al., 2017 b

ACE acesulfame; ASP aspartame; CYC ciclamato; SAC sacarina; SUC sucralosa; ESI ionización por electrospray; MS espectrometría de masas.

1.3.2 MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS

Estas metodologías no conllevan procesos de reparto entre dos fases, y en ocasiones pueden llevar a la detección de los analitos de manera directa. Incluyen los métodos electroquímicos, espectrofotométricos y la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés).

1.3.2.1 TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Como en la mayoría de las metodologías desarrolladas para el análisis de edulcorantes artificiales, se ha empleado espectrofotometría para el análisis individual de los mismos, con en el caso de la SAC, analizada en muestras simples mediante la formación de un compuesto cromóforo entre p-cloranil y SAC en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el compuesto resultante (rojo-violáceo) es detectable a 550 nm, obteniendo límites de detección (LODs) de 1.55×10^{-5} mol L^{-1} (Weinert et al., 2004; Zygler et al., 2009).

Sin embargo, conforme a la complejidad de la matriz analítica que puede contener una mezcla de edulcorantes las técnicas espectrofotométricas se encuentran limitadas en su aplicación. Así pues, hace necesario el desarrollo de técnicas que permitan la detección multianalito de los mismos. En este sentido, Llamas y colaboradores (2008) realizaron el análisis de SAC y ACE en presencia de ASP como interferente, aplicado a muestras sencillas de edulcorantes artificiales logrando obtener LODs de 0.32 y 0.09 mg L^{-1} respectivamente.

De manera adicional, también se encuentran descritas determinaciones de edulcorantes artificiales como SAC, CYC, ASP y ACE mediante la implementación de herramientas quimiométricas en análisis por espectrometría RAMAN e infrarrojo (IR) (Zygler et al., 2009).



1.3.2.2 MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Las técnicas electroquímicas se basan en la aplicación de un potencial con el fin de lograr una transformación química en los analitos de interés. Representan una herramienta poderosa y versátil para la determinación de edulcorantes artificiales debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo. Sin embargo, tienen la limitación de no poder realizar análisis multianalito, por lo que las técnicas reportadas generalmente son para un solo edulcorante. Se han reportado diferentes métodos para la detección, cuantificación y remoción de ASP y SAC entre los que se incluyen métodos potenciométricos y, amperométricos mediante el implemento de sensores así como métodos de oxidación (Zygler et al., 2009; Lin et al., 2017). La Tabla 5 contiene una recopilación de las técnicas desarrolladas para la determinación y/o remoción de edulcorantes.

Tabla 5. Métodos electroquímicos para la determinación y/o remoción de edulcorantes artificiales.

Edulcorante	Muestra	Electrodo/Técnica	LOD	Referencia
SAC	Edulcorantes comerciales	Valoración potenciométrica con Ag^+ utilizando electrodo indicador de plata	2.5 mg L^{-1}	Carlioni et al., 2003
ASP	Alimentos	Biosensor potenciométrico basado en carboxil estearasa y alcohol oxidasa. Electrodo de oxígeno disuelto	$5.0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	Odaci et al., 2004
SAC	Alimentos	Electrodo potenciométrico de membrana usando aliquat 336S-sacarinato como ionóforo	$5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	Elmosallamy et al., 2005
ASP	Bebidas	Biosensor amperométrico. Electrodo composite grafito epoxy modificado con carboxil estearasa y alcohol oxidasa	$2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	Kirgöz et al., 2006
SAC	Alimentos	Electrodo potenciométrico de segunda especie $\text{Hg} \text{Hg}_2(\text{SAC})_2$	$3.9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	Santini et al., 2008
SAC	Edulcorantes comerciales	Electrodo potenciométrico basado en una membrana de polipirrol	$3.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	Álvarez et al., 2010



1.4 ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (CE) es una técnica analítica centrada en la separación de iones presentes en una solución por la acción de un campo eléctrico, basada en la diferencia de migración de los analitos expuestos a éste, principalmente por la relación masa/carga que poseen. En el sistema de CE, al aplicar un determinado voltaje, se pueden separar los componentes de una disolución dentro de un tubo capilar de sílice fundida (SiO_2) (Harris, 2010).

La CE es una técnica de separación versátil y robusta que provee rapidez y eficiencia, además de una buena separación en los análisis químicos, que utiliza pequeños volúmenes de muestra y solventes (Herrero et al., 2010). Debido a las ventajas que la técnica posee ha sido ampliamente utilizada para el análisis de edulcorantes artificiales, estando las modalidades de electroforesis capilar de zona (CZE) y la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) dentro de las más implementadas, aunque CZE sea por mucho la más utilizada generalmente acoplada a detectores espectrofotométrico UV-vis, y de arreglo de diodos (DAD). El uso de este tipo de detectores se ve limitado dado que, aunque la mayoría de los edulcorantes artificiales poseen dentro de su estructura química grupos cromóforos, no es así para todos los casos (Zygler et al., 2009).

En la Tabla 6 se ejemplifican algunas de las metodologías desarrolladas para el análisis de edulcorantes artificiales en diferentes matrices analíticas. De acuerdo a estas se observa que los electrolitos soporte (ES) mayormente utilizados están ajustados en un intervalo de 8.4 a 9.5 en la escala de pH para análisis de edulcorantes artificiales, utilizando generalmente detector UV-Vis, y obteniendo LODs que varían entre los g L^{-1} y los mg L^{-1} . Debido a que en CE se inyectan volúmenes de muestra en el orden de μL o nL , los LODs obtenidos no son los adecuados para el análisis de ECs, sobre todo cuando se utilizan detectores UV-Vis.



Tabla 6. Métodos basados en CE para la detección de edulcorantes artificiales

Edulcorante y/o analitos	Muestra	Electrolito soporte	Especificaciones	LOD	Referencia
ASP, ácido benzoico y cafeína	Bebidas	Glicina 20 mM (pH 9.0)	Capilar 44 cm x 50 μ m 20 kV; 35 °C UV-Vis; 215 nm	1.5 mg L ⁻¹	Walker et al., 1997
ASP, ACE, SAC, conservadores y colorantes	Refrescos	Carbonatos 20 mM y dodecilsulfato de sodio (SDS) 62 mM (pH 9.5)	Capilar 48.5 cm x 50 μ m 200 nm; 20 kV MEKC	0.01-1.0 mg mL ⁻¹	Frazier et al., 2000
ASP, ACE, SAC, dulcina y conservadores	Frutos en conserva	Desoxicolato de sodio 0.05 M, fosfatos-boratos 0.02 M y acetonitrilo 5% (pH 8.6)	Capilar 57 cm UV-Vis; 214 nm	10-25 μ g g ⁻¹	Lin et al., 2000
SAC y ASP	Edulcorantes comerciales	Tetraborato de sodio 20 mM (pH 9.4)	Capilar sílice fundida (64.5 cm x 50 μ m) 20 kV UV-Vis; 210 nm	0.001 y 0.1 g L ⁻¹	Cantarelli et al., 2008
ASP, CYC, SAC y ACE	Refrescos	Tris-hidroximetil aminometano 100 mM e histidina 10 mM (pH 9.4)	Capilar 70 cm x 75 μ m 30 kV CE-C4D	4.2, 2.5, 1.5, 1.4 mg L ⁻¹	Bergamo et al., 2011
ASP, ACE, CYC y SAC	Edulcorantes comerciales	Tetraborato de sodio 20 mM, Tris 15 mM, ácido benzoico 7.5 mM (pH 9.15)	Capilar 48.5 cm x 50 μ m 20 kV; 30 °C UV-Vis; 215 nm	0.5-12 mg L ⁻¹	Oliveira et al., 2013
ASP, ACE, CYC y SAC	Alimentos y fármacos	Tris 45 mM y ácido benzoico 15 mM (pH 8.4)	Capilar 48.5 cm x 50 μ m 220 nm -30 kV	5.1, 3.3, 3.3, 6.4 mg L ⁻¹	Vistuba et al., 2015

Para resolver la problemática de LODs por encima de los requerimientos actuales, se han implementado diversas técnicas de preconcentración que cuales permitan mejorar la sensibilidad del sistema electroforético (Yang et al., 2015). En el desarrollo de estas nuevas técnicas, se dio origen a las técnicas en línea (*on-line*), basadas en la modificación del sistema electroforético convencional sin alterar las propiedades del analito. Dentro de las ventajas que presentan este tipo de técnicas es que generalmente no requieren etapas adicionales en el pretratamiento de la muestra, disminución en tiempo de análisis, y alta eficiencia (Puig et al., 2008; Li et al., 2018). Dentro de las mismas, se encuentran la preconcentración transitoria en isotacoforesis (tITP) (Crevillén et al., 2017), preconcentración en campo amplificado (Li et al., 2012), interfase dinámica de pH (Xu et al., 2018) y preconcentración por barrido (Chen et al., 2012).

1.4.1 TÉCNICAS DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA

De manera general, las técnicas de preconcentración *on line* se llevan a cabo dentro del capilar como parte del proceso electroforético, y presentan diferentes ventajas importantes como altos factores de preconcentración, sin modificación en las propiedades físicas y químicas de los analitos, y el uso de volúmenes de muestra en el orden de nL (Simpson et al., 2008; Chen et al., 2012). Estas técnicas requieren de la evaluación de factores específicos como el modo y volumen de inyección, la composición del o los ES, y el volumen de muestra óptimos.

1.4.1.1 TÉCNICAS ISOTACOFORÉTICAS (tITP)

La isotacoforesis (ITP) es una técnica electroforética que tiene lugar en un sistema discontinuo de soluciones electrolito donde los analitos se separan como zonas sucesivas de acuerdo al orden de disminución de las movilidades electroforéticas. Generando electroferogramas diferentes a los tradicionales en donde la separación se lleva paso a paso. En esta modalidad, como se muestra en la figura 7, los analitos son inyectados entre el



"electrolito principal" (de alta movilidad) y el "electrolito terminal" (de menor movilidad que cualquier analito en la matriz) (Simpson et al., 2008; Wang et al., 2016).

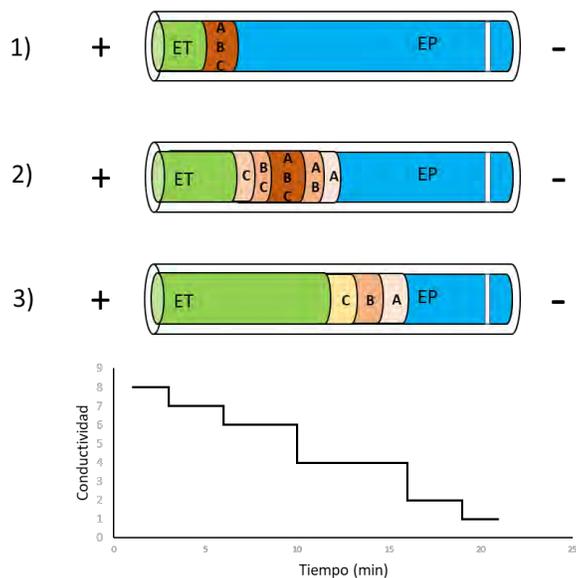


Figura 7. Esquema del proceso isotacoforético: 1) estado inicial, 2) inicio de la separación por aplicación de voltaje, 3) separación terminada, y electroferograma obtenido por una separación isotacoforética. EP: electrolito principal, ET: electrolito terminal, A, B y C: analitos.

La isotacoforesis es un modo de separación de CE que puede ser aplicado para preconcentración en línea, dicha técnica se conoce como *transient isotachophoresis* (tITP) donde se lleva a cabo la preconcentración mediante el principio de separación de ITP.

En tITP, la muestra que contiene analitos iónicos, puede ser inyectada de manera hidrodinámica entre el electrolito terminal y el principal como en una separación por ITP convencional, o ir disuelta dentro del electrolito terminal. Como en la mayoría de las técnicas de preconcentración en línea, tITP se basa en el cambio de movilidad electroforética de los analitos entre la zona de la muestra y la de los ES mediante la aplicación de un campo eléctrico y/o por el cambio de la carga efectiva del analito, haciendo

que se precentren en una zona pequeña y específica antes de la separación y detección (Simpson et al., 2008; Chen et al., 2012).

Esta técnica de precentración se puede aplicar únicamente para analitos en muy bajas concentraciones (Kitagawa et al., 2014). Se ha descrito el uso de la tITP para la precentración y separación de gran variedad de analitos como fosfopéptidos, opioides, estrógenos, bacterias, ácidos aromáticos, glicanos, y fragmentos de ADN, entre otros en diferentes tipos de muestras (Simpson et al., 2008, Chen et al., 2012, Kitagawa y Otsuka 2014, Kawai et al., 2018).

Otra modalidad de precentración en línea que se rige por el principio isotacoforético es la *Electrokinetic supercharging* (EKS). La EKS implica inyección electrocinética por un intervalo de tiempo más grande con el fin de introducir la mayor cantidad posible de analito, seguida de la precentración por tITP para ubicar los analitos en una zona de interés dentro del capilar, también conocida como zona aguda.

Está considerada como una de las técnicas de precentración en línea más eficiente, que permite el análisis de muestras biológicas y ambientales que contienen analitos a nivel traza. Se ha reportado el uso de esta técnica para detección de antiinflamatorios no esteroideos en concentraciones de ng L^{-1} (Chen et al., 2012; Kitagawa y Otsuka 2014).

1.4.1.2 INYECCIÓN DINÁMICA DE pH

Esta técnica de precentración se basa en el principio en que, si se tiene un medio con zonas a distintos pH's dentro del capilar, donde se generan cambios significativos en el grado de ionización de los analitos al cruzar de una zona a otra, permitiendo de esta forma cambiar la velocidad electroforética de los mismos (Tascon 2015). Por lo tanto, esta técnica es ampliamente utilizada para el *stacking* de compuestos débilmente ácidos y básicos, logrando precentrar selectivamente analitos que se encuentren en un intervalo pequeño en cuanto a sus valores de pKa (Simpson et al., 2008; Kitagawa y Otsuka 2014).



Generalmente, para la preconcentración de ácidos débiles se requiere el uso de un electrolito soporte de alta concentración y pH alcalino, pero baja movilidad electroforética. Así como, una matriz analítica de alta concentración ácida que presente alta movilidad para la especie iónica (Simpson et al., 2008).

A lo largo del desarrollo de esta técnica de preconcentración se ha reportado su aplicación a la preconcentración y separación de diferentes analitos como aminoácidos, péptidos, proteínas, hormonas, farmacéuticos, entre otros (Simpson et al., 2008; Chen et al., 2012; Kitagawa y Otsuka 2014; Xu et al., 2015).

1.4.1.3 PRECONCENTRACIÓN POR BARRIDO (*SWEEPING*)

El *sweeping* es una técnica de preconcentración *on line* de amplio uso, que se basa en los cambios en la migración electroforética debida a las interacciones entre los analitos y una fase pseudoestacionaria. En esta técnica los analitos que generalmente se encuentran en estado neutro y/o son hidrofóbicos, son retenidos y acumulados por una fase pseudoestacionaria, que generando micelas penetra en la zona de la muestra. De esta forma, la interacción entre las micelas y los analitos presentes en las muestras permite la preconcentración de los mismos. Para la correcta aplicación de esta técnica de preconcentración, se ajusta la conductividad de la matriz analítica a la del electrolito soporte, sin agregar solventes orgánicos ni agentes tenso activos (Chen et al., 2012; Tascon, 2015).

Originalmente, esta técnica fue desarrollada como técnica de preconcentración *on line* basándose en el principio de separación de MEKC, ya que la mayoría de las técnicas *on line* se enfocan en analitos iónicos, de preferencia cargados negativamente (Simpson et al., 2008). Dentro de los analitos preconcentrados por *sweeping* se encuentran los aminoácidos, compuestos hidrofóbicos, glucósidos, esteroides, entre otros (Simpson et al., 2008, Chen et al., 2012; Kitagawa y Otsuka 2014; Xu et al., 2015).



La figura 8 representa los esquemas de preconcentración en línea tanto para las técnicas de *sweeping* y la de inyección dinámica de pH de manera sencilla.

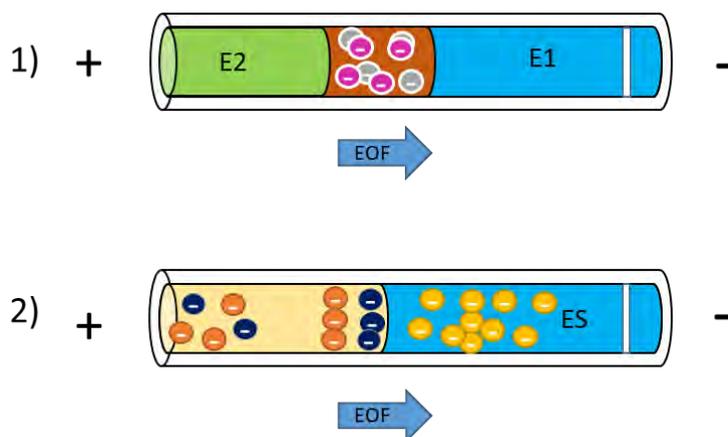


Figura 8. Diagramas de preconcentración en línea de las técnicas: 1) inyección dinámica de pH, representando como E1 y E2 los ES con diferentes valores de pH, 2) preconcentración por *sweeping* en donde los agentes surfactantes dentro del ES son los que permitirán la preconcentración.

1.4.1.4 PRECONCENTRACIÓN POR CAMPO AMPLIFICADO

La preconcentración por campo amplificado conocida como FASS por sus siglas en inglés (Field-Amplified Sample Stacking o Fiel-Enhanced Sample Stacking, FESS) es una técnica de preconcentración ampliamente utilizada debido a su simplicidad en cuanto a preparación de la muestra y del electrolito soporte (Simpson et al., 2008). Se basa en la diferencia de conductividades entre la matriz de la muestra y el medio del electrolito soporte (Chen et al., 2012; Wang et al., 2016). En FASS una muestra de baja conductividad se inyecta de manera hidrodinámica dentro del capilar previamente lleno de la solución de electrolito soporte. Debido a que la fuerza del campo eléctrico es inversamente proporcional a la conductividad eléctrica, se aplica un campo más alto a la zona donde se encuentra la matriz de la muestra en relación con la zona del electrolito soporte. Por lo tanto, la migración

electroforética de los analitos iónicos en la zona de la matriz es más rápida que la del electrolito, lo que provoca el apilamiento o “*stacking*” de los mismos, alrededor del límite de ambas soluciones (Kitagawa y Otsuka 2014). Con el objetivo de disminuir la conductividad de las muestras que se desea analizar mediante este tipo de técnica, se recurre a la dilución de las mismas (Chen et al., 2012).

La técnica de FASS ha sido ampliamente utilizada en el estudio de analitos como aminas alifáticas, albúmina, transferrina, alcaloides derivados de isoquinolinas, bisfenol A y F (así como sus derivados), metales pesados, péptidos, aniones inorgánicos y compuestos de arsénico (Kitagawa y Otsuka 2014).

Con el objetivo de mejorar los niveles de sensibilidad, FASS implementa otras técnicas de preconcentración en línea que varían en el método de inyección de las muestras o el acoplamiento con distintos detectores como *field-amplified sample injection* (FASI), *large volume sample stacking* (LVSS) (Chen et al., 2012; Kitagawa y Otsuka 2014; Wang et al., 2016).

1.4.1.4.1 INYECCIÓN DE MUESTRA POR CAMPO AMPLIFICADO (FASI)

Esta técnica sigue el mismo principio de FASS y solo difiere en el método de inyección *field-amplified sample injection* (FASI). En orden de obtener mejores factores de enriquecimiento en la preconcentración, se puede hacer uso de FASI, en donde un mayor volumen de muestra será inyectado de manera electrocinética dentro del sistema FASS-CE.

1.4.1.4.2 PRECONCENTRACIÓN POR VOLUMEN DE MUESTRA (LVSS)

En esta modalidad de FASS, un mayor volumen de una muestra (hasta el 90% del volumen total del capilar) de baja conductividad es inyectada dentro del sistema electroforético. Para llevar a cabo análisis mediante *large volume sample stacking* (LVSS) con cambio de polaridad, primero se inyecta una gran cantidad de muestra de manera hidrodinámica al



capilar y después se aplica un voltaje en polaridad inversa para asegurar la retención de los analitos y expulsar la fase acuosa de la matriz del capilar. La migración de los analitos se realiza conforme la movilidad que poseen en el electrolito soporte. Posteriormente, al incidir una polaridad normal se lleva a cabo la separación y análisis, obteniendo finalmente la señal de una muestra preconcentrada (Figura 9).

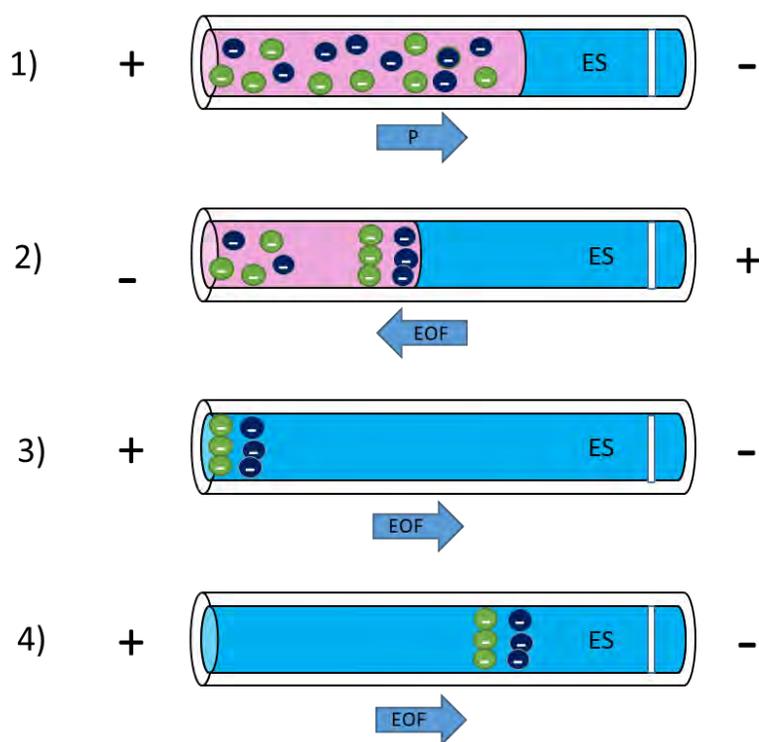


Figura 9. Esquema del mecanismo de preconcentración mediante LVSS. 1) Inyección de la muestra de baja conductividad, 2) aplicación de voltaje negativo para preconcentrar los analitos y eliminar la matriz del capilar, 3) la polaridad del sistema es cambiada a modo normal y 4) los analitos son separados por electroforesis convencional. ES: electrolito soporte.

Dentro de las ventajas que presenta LVSS es que se trata de una técnica sensible, robusta y barata, que requiere pequeños volúmenes de muestra y solventes. Además, puede aplicarse al análisis de una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos tales como metales (Cheng et al., 2016), quinolonas (Wang et al., 2016), sulfonamidas (Wang et al., 2016), flavonoides (Lee et al., 2012), aminas (Malinina et al. 2018), compuestos quirales (Kawai et al., 2012), tetraciclinas (Moreno-González et al. 2018), y agua (Li et al. 2012), así como muchos otros.

El implemento de técnicas de preconcentración en línea para el análisis de edulcorantes artificiales ha sido descrito por Yang y colaboradores (2015), en donde se llevó a cabo la determinación analítica de CYC, SAC y ACE en bebidas mediante preconcentración por campo amplificado en la modalidad de FASI acoplado a un detector de conductividad sin contacto acoplada capacitivamente (CE-C⁴D). Obteniendo límites de detección de 4.4, 6.7 y 8.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ACE, SAC y CYC respectivamente, generando así una metodología sensible y reproducible.

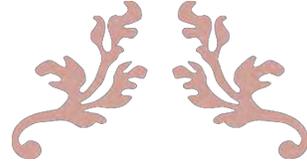
Sin embargo, no todos los equipos electroforéticos cuentan con acoplamientos a detectores que permitan aumentar la sensibilidad analítica de las metodologías desarrolladas. Es por ello que, se ha desarrollado el uso tanto de técnicas de preconcentración en línea como de aquellas en discontinuo (Puig et al., 2008) con la finalidad de disminuir en orden de concentración los LODs en detectores como el UV-Vis.

En las técnicas tradicionales de preconcentración, también conocidas como fuera de línea o en discontinuo (*off-line*), la preconcentración y el análisis por CE se hace en etapas separadas (Lee et al., 2012). Las más empleadas son las extracciones en fase sólida (SPE) (Arbeláez et al., 2015), y las extracciones líquido-líquido (LLE) (Núñez et al., 2017). Estas técnicas son ampliamente utilizadas en el pretratamiento de las muestras principalmente para la preconcentración de las mismas, sin embargo, hay ocasiones en las que se utilizan como métodos de limpieza principalmente para su acoplamiento con técnicas de preconcentración en línea en dónde las muestras deben de presentar baja conductividad.



Con base en lo anterior, el presente trabajo está enfocado en el desarrollo de una técnica económica, rápida y efectiva de preconcentración en línea y análisis en simultáneo de 5 de los edulcorantes más utilizados a nivel mundial ACE, ASP, CYC, SAC y FEN mediante CE-UV en diferentes muestras de agua. Adicionando el uso de SPE como método de limpieza dentro del tratamiento de las muestras.





OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y aplicar un sistema de preconcentración en línea mediante electroforesis capilar para el análisis de edulcorantes presentes en muestras de agua potable, de manantial y de consumo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

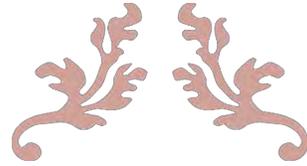
- ◆ Establecer las condiciones de separación y análisis simultáneo de edulcorantes como acesulfame-K (ACE), sacarina (SAC), aspartame (ASP), ciclamato (CYC) y fenilalanina (FEN), mediante electroforesis capilar de zona con detector UV-Vis.

- ◆ Diseñar y evaluar el sistema de preconcentración en línea mediante electroforesis capilar bajo el esquema de preconcentración por campo amplificado en modalidad de large volumen sample stacking.

- ◆ Determinar y evaluar los parámetros analíticos de ambas metodologías desarrolladas para el análisis de edulcorantes artificiales.

- ◆ Aplicar el método propuesto en el análisis de edulcorantes presentes en muestras de agua de consumo, agua potable y agua de manantial.





METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo grado analítico en agua desionizada con una resistividad específica menor de 18.0 MΩ cm de un sistema Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). El tetraborato de sodio, ácido pícrico, hidróxido de sodio, y el ácido clorhídrico fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), el benzoato de sodio de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) y el metanol de Mallinckrodt Baker (Xalostoc, Mexico). Las distintas soluciones estándar fueron preparadas mediante diluciones de soluciones madre de SAC, ACS-K, CYC, ASP y FEN (todas de Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA) a concentraciones de 500 y 100 mg L⁻¹. Dichas soluciones se almacenaron a 4°C y se renovaron cada tercer día. La solución de electrolito soporte consistió en tetraborato de sodio 5.0 mmol L⁻¹ y benzoato de sodio 0.5 mmol L⁻¹, ajustado a pH 9.0. El ácido pícrico fue utilizado como estándar interno en concentraciones de 5.00 y 0.15 µg mL⁻¹ para los procedimientos de CE-UV y CE-LVSS, respectivamente.

3.2 MATERIAL Y EQUIPO

Al inicio de cada día de trabajo el capilar se activaba con NaOH 1.0 M durante 15 min, seguido por NaOH 0.1 M durante 10 min, agua desionizada por 10 min y finalmente la solución de electrolito soporte por 10 min. El capilar se lavaba entre cada análisis mediante la siguiente secuencia: NaOH 1.0 mol L⁻¹ por 4 min, NaOH 0.1 mol L⁻¹ por 2 min, agua desionizada por 2 min y electrolito soporte por 4 min. Todos los lavados se realizaron a una presión de 20 psi.

Los análisis se realizaron en un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500, con detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda (λ) de 215 nm. Los datos obtenidos fueron adquiridos y analizados mediante el software P/ACE MDQ versión 2.3. Se utilizó un capilar



de sílice fundida (41.7 cm x 75 μm de diámetro interno) para las separaciones, así como un potenciómetro (modelo 450; Corning Science Products, NY, USA) para el ajuste del pH de la solución de electrolito soporte, con precisión de 0.1 unidades.

3.3 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA ELECTROFORÉTICO

La optimización del sistema se realizó mediante el método univariable la cual involucra 5 etapas, I) identificación de las variables a optimizar, II) identificación y selección de los factores que afectan el sistema, III) selección de las restricciones de cada factor, IV) análisis de los datos y determinación de las condiciones óptimas y V) experimento confirmatorio bajo las condiciones óptimas obtenidas. En la optimización de cada variable se utilizó una solución patrón con concentración de 50 mg L⁻¹ de cada edulcorante.

3.4 CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA EL SISTEMA CE-UV

Las condiciones de separación fueron para el proceso de separación convencional (CE-UV): modo de inyección hidrodinámico a 0.5 psi por 5 seg, capilar a temperatura de 25 °C, voltaje de separación 18 kV, y separación en polaridad normal.

3.5 CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA EL SISTEMA CE-LVSS

Para el proceso de preconcentración (CE-LVSS): modo de inyección hidrodinámico a 0.5 psi por 60 s, capilar a temperatura de 25 °C, voltaje de preconcentración 8 kV en polaridad inversa y tiempo de preconcentración 60 s.



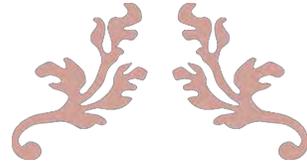
3.6 OBTENCIÓN Y COMPARACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS CE-UV Y CE-LVSS.

La obtención de los parámetros analíticos para ambas metodologías se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC (Currie 1995) tanto para el cálculo de LODs como de LOQs. Adicionalmente se realizaron análisis de reproducibilidad y repetitividad evaluados a dos niveles de concentración, obteniendo %DER menores al 10% como está permitido de acuerdo al orden de concentraciones de trabajo.

3.7 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

1.0 mL de cada muestra fue fortificado con una solución de estándar interno (0.15 mg L^{-1}) y aforado con agua desionizada a un volumen final de 10 mL. La solución obtenida se hizo pasar por un cartucho de extracción en fase sólida (Discovery DSC-18, 500 mg) previamente activado con 5 mL de metanol (MeOH) seguido de 5 mL de agua desionizada a un flujo máximo de 1 mL min^{-1} . Después de la retención, el cartucho de SPE fue lavado para eliminar impurezas con 2.0 mL de MeOH al 5.0 % (v/v). Posteriormente, los analitos retenidos fueron eluidos con 2.0 mL de MeOH. Finalmente, la solución de eluato fue evaporada a sequedad mediante calentamiento y aire, para ser reconstituida en 1.0 mL de agua desionizada. Las muestras obtenidas, fueron inyectadas en el sistema electroforético por inyección hidrodinámica a 5 psi durante 60 s, siguiendo el procedimiento electroforético.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA ELECTROFORÉTICO CONVENCIONAL (CE-UV)

4.1.1 EFECTO DEL pH EN EL SISTEMA DE SEPARACIÓN

Debido a que la CE es una técnica basada en la separación de iones presentes en una solución por la acción de un campo eléctrico, es necesario que los analitos se encuentren en forma iónica para poder llevar a cabo la separación. Al mantener un pH de trabajo mediante el uso de electrolitos soporte (ES) de distinta composición, se asegura que los analitos de interés se encuentren en su forma desprotonada, generando así una carga negativa para que exista movilidad electroforética en el sistema.

Con base en los diferentes valores de pKa que poseen los analitos de interés se construyeron los diagramas de zonas de predominio (DLZP) para cada especie (Figura 8) y se concluyó que el mejor intervalo de evaluación para la determinación simultánea de los analitos de interés se encuentra por encima de 9.3 en la escala de pH asegurando que todos tengan carga negativa. Para corroborar los obtenidos con los DLZP y con los datos bibliográficos acerca de la determinación de edulcorantes artificiales mediante CE, se realizó la evaluación del efecto del pH en la solución de ES en un intervalo de 8.0 a 12.0 preparados con la sal respectiva de boratos o fosfatos de acuerdo al pH requerido. Todos los ES evaluados se prepararon a una concentración de 25 mM de acuerdo a la bibliografía (Zygler et al., 2009).

Durante este estudio se analizó una solución estándar que contenía a los 5 edulcorantes (ACE, SAC, CYC, FEN Y ASP) en una concentración de 50 mg L⁻¹, mientras que las condiciones de separación fueron 18 kV a una longitud de onda (λ) de 215 nm.



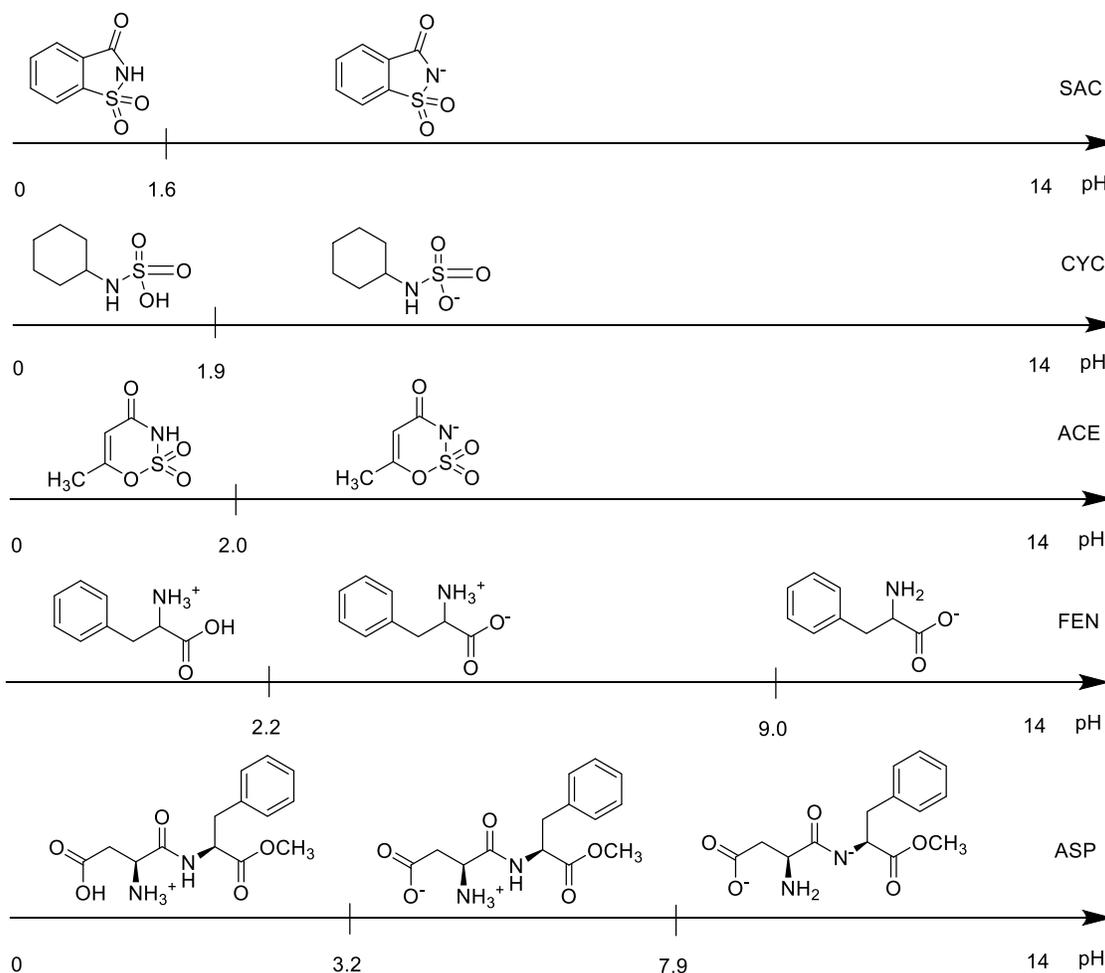


Figura 10. Diagramas lineales de zonas de predominio de los edulcorantes de interés: FEN, SAC, CYC, ACE y ASP de acuerdo con sus valores de pKa.

En la figura 10 se muestran los electroferogramas obtenidos de esta evaluación. Como resultado se obtuvo que en los electroferogramas correspondientes a la evaluación de los valores de pH de 8, 10, 11 y 12 no se observa una buena resolución e incluso en algunas ocasiones no existe la presencia de señales analíticas que se puedan relacionar con los analitos presentes en la muestra. Esto concuerda con los DLZP trazados que muestran que la mejor resolución y separación de los analitos de interés se lleva a cabo a pH 9.0, ya que todos los analitos se encuentran cargados negativamente, incluyendo a la FEN y al ASP cuyos valores de pKa más altos son los que dan lugar a la formación de las especies negativas, así como la posible afectación de la doble capa en el sistema electroforético a

valores de pH superior a 10 por lo que se modifica la movilidad electroforética de los analitos de interés afectando de forma significativa la separación y resolución analítica del sistema.

Experimentalmente se observó la presencia de 4 señales que podemos atribuir a los edulcorantes analizados (Figura 11), este resultado se corroboró con la bibliografía en donde algunos autores han utilizado soluciones de ES con valores de pH dentro del intervalo de 8.4 a 9.5 para la separación y determinación de edulcorantes artificiales, utilizando generalmente sal de borato de sodio dentro de la composición del ES (Cantarelli et al., 2008; Oliveira et al., 2013).

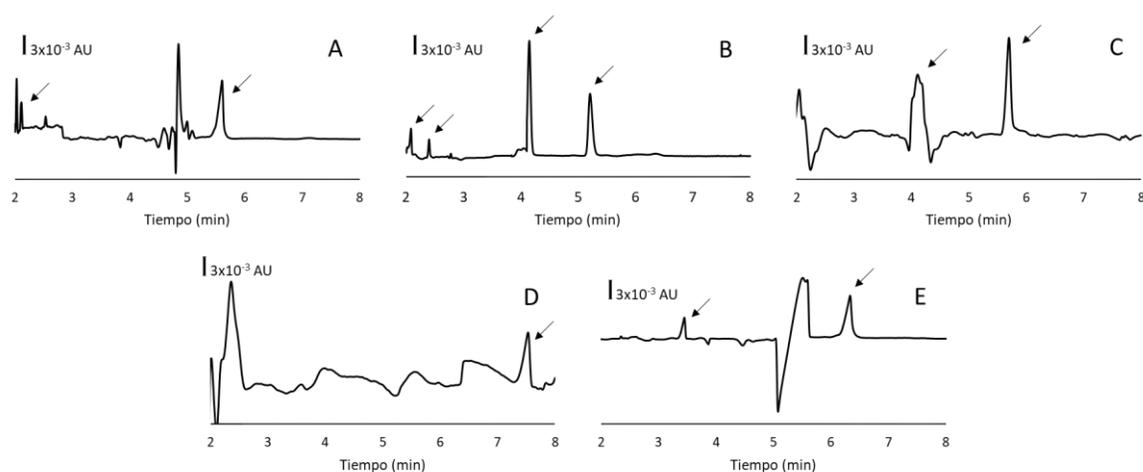


Figura 11. Electroferogramas correspondientes a la evaluación de pH. A) ES de fosfatos pH=8, B) ES de boratos pH=9, C) ES de boratos pH=10, D) ES fosfatos pH=11, E) ES de fosfatos pH=12. 18 KV, $\lambda=215$ nm.

Debido a que en la solución patrón utilizada para los análisis existen 5 analitos y solo se observa la presencia de 4 señales analíticas, se puede inferir que uno de los analitos no presenta absorbancia. Esto concuerda con la estructura química del CYC que no presenta absorbancia al no poseer grupos cromóforos, por lo que se plantea la detección indirecta del mismo al modificar la composición del ES.



4.1.2 COMPOSICIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE

En esta sección se establece que la adición de un agente cromóforo en la composición del ES permitirá la detección indirecta del CYC, sin afectar la separación y detección de los edulcorantes tal y como fue descrito por Oliveira y colaboradores (2013), y Vistuba y colaboradores en 2015.

Como agente cromóforo se evaluó el uso por separado de ftalato ácido de potasio, benzoato de sodio y ácido pícrico (5 mM) dentro de la solución de ES ajustado al pH seleccionado como óptimo para la separación. El resultado buscado en esta evaluación fue generar en el electroferograma una señal analítica negativa correspondiente a la detección del CYC. Para ello, los análisis se realizaron aplicando 18 kV a la separación de una solución estándar que contenía los 5 edulcorantes de trabajo y a una λ de 215 nm.

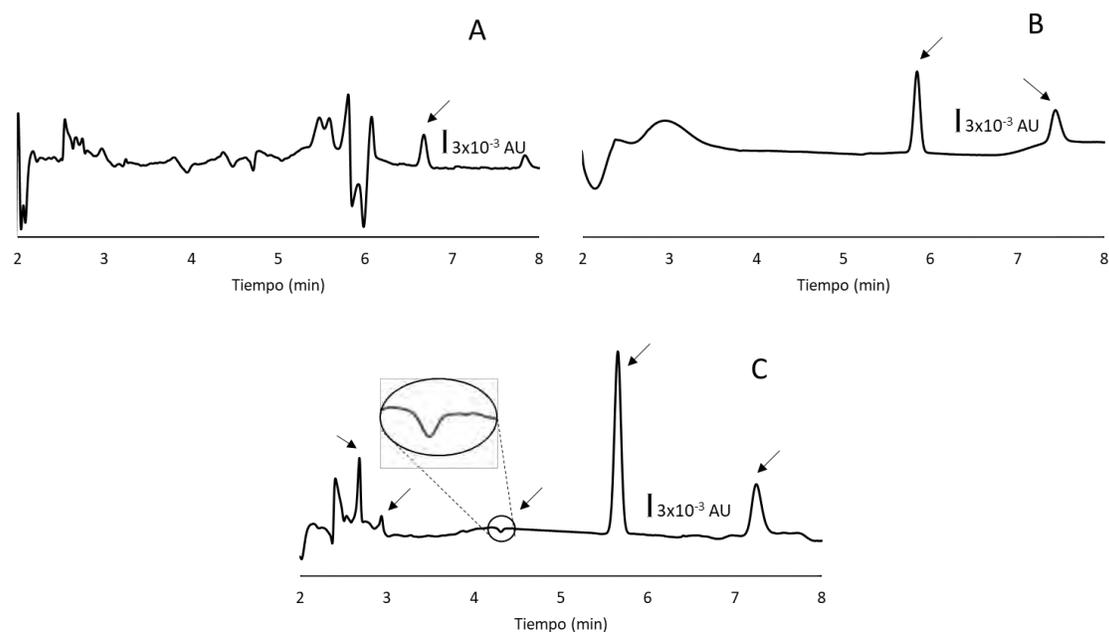


Figura 12. Electroferogramas obtenidos mediante el uso de ES de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 25 mmol L^{-1} ajustados pH 9.0, a $\lambda=215$ nm y 18 kV. A) biftalato de potasio 5 mmol L^{-1} , B) ácido pícrico 5 mmol L^{-1} y C) benzoato de sodio 5 mmol L^{-1} .

Conforme a los electroferogramas obtenidos (Figura 12), el uso del benzoato de sodio dentro del ES, permite la detección en simultáneo de los analitos tanto de manera directa como indirecta. Por lo que se evaluó el efecto de la concentración del mismo presente en el electrolito soporte.

En una primera etapa se evaluaron concentraciones de 5.0-20 mmol L⁻¹ de acuerdo a la bibliografía consultada, esperando que al aumentar la concentración del agente cromóforo se incrementara la señal analítica correspondiente al CYC. De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que en efecto, conforme aumenta la concentración del benzoato la señal del CYC incrementa; sin embargo, con este incremento de concentración se observa una pérdida en la resolución analítica, afectando de manera directa la detección de los analitos. Por ello, se planteó la evaluación del uso del benzoato de sodio en concentraciones aún más bajas, en un intervalo de 0.5-5 mmol L⁻¹, con el objetivo de mejorar la resolución de las señales sin incrementar las interferencias en los electroferogramas, obteniendo finalmente, que la concentración óptima para el análisis de los edulcorantes de interés por electroforesis capilar de zona fue 0.5 mmol L⁻¹.

Es importante mencionar que, al igual que con el benzoato de sodio, se optó por disminuir la concentración de tetraborato de sodio, manteniendo una relación milimolar entre el benzoato y el tetraborato de sodio de 1:10. Encontrando que la mejor composición para el electrolito soporte fue tetraborato de sodio 5 mmol L⁻¹ y benzoato de sodio 0.5 mmol L⁻¹. Esta combinación genera una mejor línea base como se puede observar en los electroferogramas de la Figura 13, además de que logra disminuir el tiempo de migración de los analitos, ya que la viscosidad del medio baja y, por lo tanto, la resistencia a la migración.



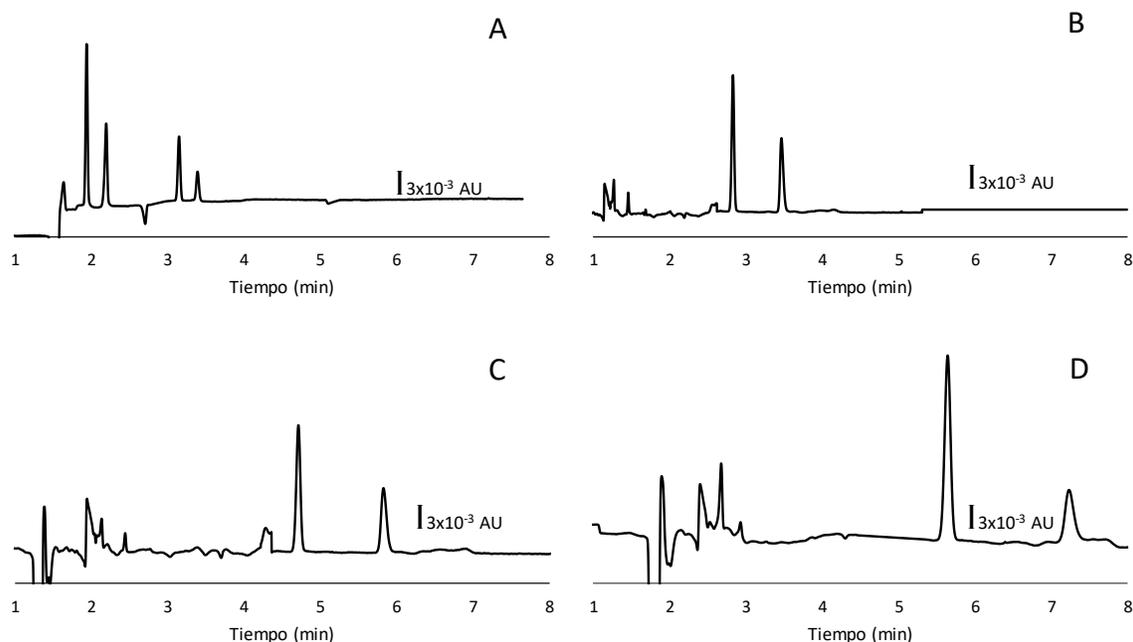


Figura 13. Electroferogramas correspondientes a la evaluación de la concentración de benzoato de sodio dentro del ES. A) 0.5 mmol L^{-1} , B) 5 mmol L^{-1} , C) 10 mmol L^{-1} , D) 20 mmol L^{-1} . 18 KV , $\lambda = 215 \text{ nm}$.

4.1.3 VOLTAJE DE SEPARACIÓN

Establecida la composición del electrolito soporte se realizó la evaluación del voltaje aplicado durante la separación electroforética (Figura 14), teniendo como objetivo de este estudio determinar si no existía diferencia significativa con la disminución del voltaje. Para ello, se prepararon soluciones de edulcorantes con concentración de 50 mg L^{-1} que fueron analizadas por electroforesis capilar, evaluando la aplicación de diferentes voltajes en la separación: 14, 16, y 18 kV.

Con base en los resultados obtenidos se deduce que, al disminuir el voltaje de separación se aumenta el tiempo de separación de los analitos, por lo que se decide continuar



trabajando con un voltaje óptimo en la separación de 18 kV, proporcionando la ventaja adicional de poder realizar un mayor número de análisis en menores periodos de tiempo.

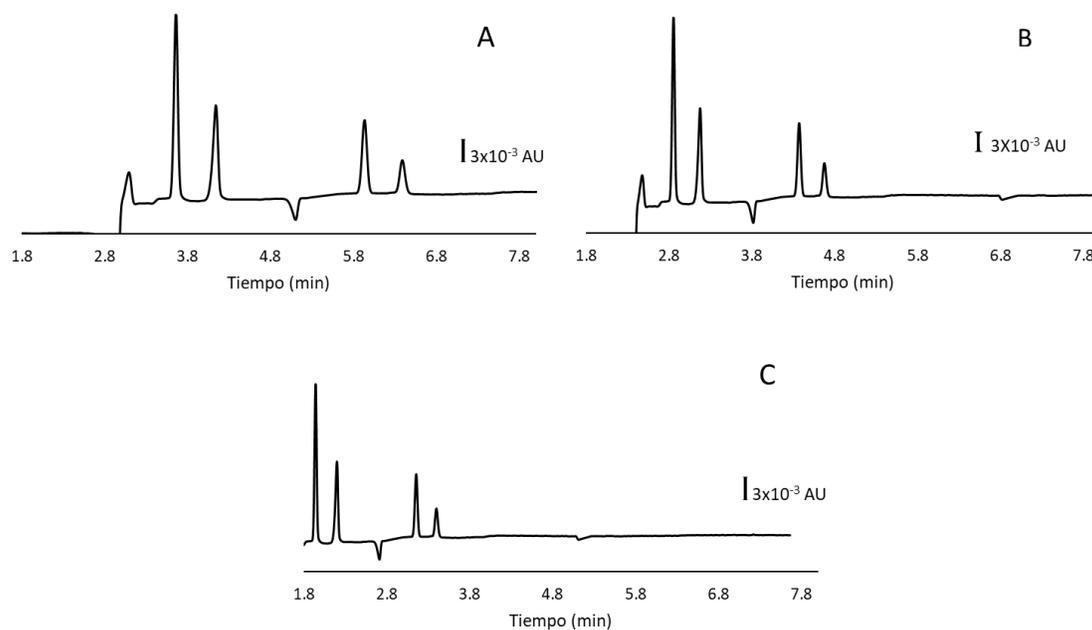


Figura 14. Electroferogramas obtenidos de una solución de edulcorantes a 50 mg L^{-1} a $\lambda=215 \text{ nm}$ y A)14 kV, B)16 kV y C) 18 kV

4.1.4 EVALUACIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO

Una vez optimizada la separación de los analitos de interés se propone el uso de un estándar interno (EI) dentro del sistema, con el objetivo de disminuir el error provocado por las variaciones instrumentales y/o el manejo de las soluciones. Así que, se evaluó el uso del ácido aspártico, ácido pícrico y biftalato de potasio como EI, en una concentración de 50 mg L^{-1} . Para ello se prepararon soluciones patrón que contenían a los 5 analitos (50 mg L^{-1}) y a cada uno de los compuestos a evaluar a la concentración descrita anteriormente.



De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 15) se puede apreciar que el ácido aspártico (Figura 15B) y el ftalato ácido de potasio (Figura 15C) generan una señal analítica dentro del tiempo de migración de los analitos de interés, sin embargo, también se observa la presencia de diversas señales analíticas en el electroferograma que se pueden deber a interferentes, generando baja resolución dentro del sistema y un desplazamiento en los tiempos de migración de los analitos, que en resumen es desfavorable para los análisis.

Por el contrario, el ácido pícrico (Figura 15A) permite la obtención de una resolución adecuada en la detección de todos los analitos sin afectar la separación de los mismos y sin la presencia de interferentes; de tal modo, se elige usar el ácido pícrico como el estándar interno óptimo.

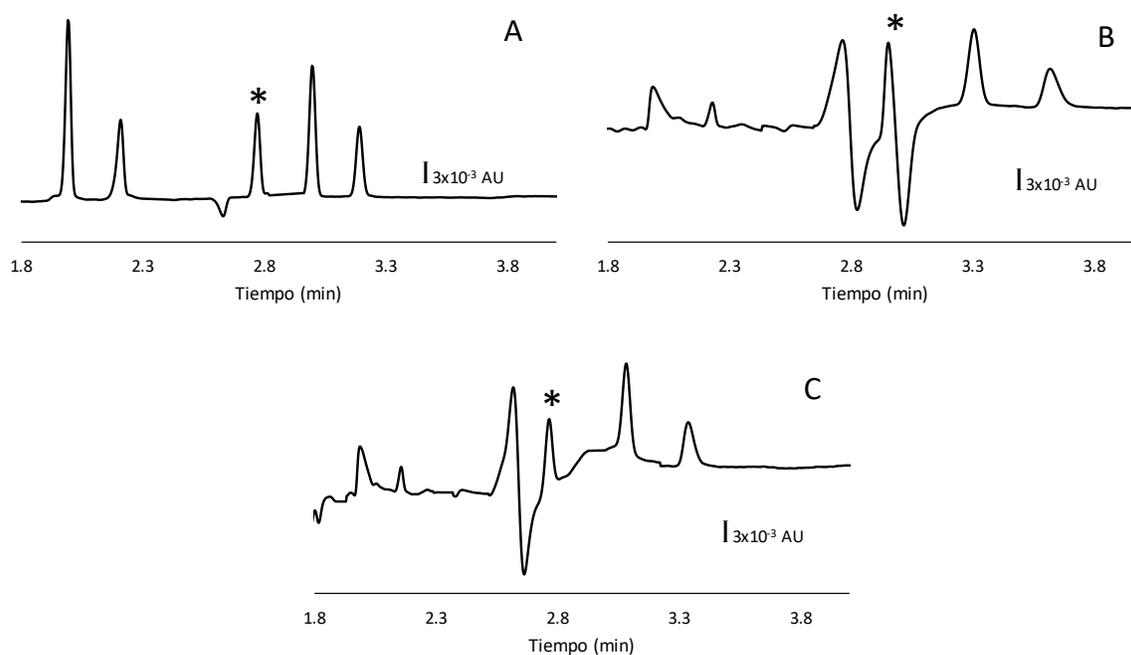


Figura 15. Electroferogramas obtenidos de la evaluación de distintos compuestos como estándar interno A) ácido pícrico, B) ácido aspártico y C) ftalato ácido de potasio. 18 kV, $\lambda = 215$ nm.

4.1.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS SEÑALES

Para la identificación de cada señal, se prepararon y analizaron soluciones individuales de cada uno de los edulcorantes junto con el estándar interno, todas en concentración conocida, permitiendo la identificación mediante sus respectivos tiempos de migración. Finalmente se analizó una solución que contenía a los 5 analitos y al EI, el análisis se llevó a cabo bajo las condiciones seleccionadas como óptimas para el sistema de CZE: 18 kV, 215 nm con ES de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5 mmol L^{-1} y benzoato de sodio 0.5 mmol L^{-1} ajustado a pH 9 (Fig. 2).

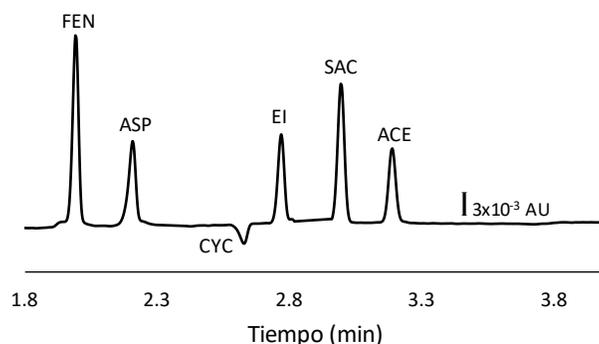


Figura 16. Electroferograma correspondiente al análisis de una solución a 20 mg L^{-1} de ácido pícrico (EI), ACE y SAC; 50 mg L^{-1} FEN, ASP y CYC. Analizada a 18 kV y $\lambda=215$ nm, buffer de boratos (5 mmol L^{-1}) y benzoato (0.5 mmol L^{-1}).

Para la correcta detección y determinación de los analitos, se consideró que cada uno de ellos posee diferente absorbancia generando diferencias significativas en términos de intensidad en la señal analítica correspondiente. Por ello, se realizaron todos los análisis manteniendo una relación en concentraciones de 1:5, teniendo en cuenta que la SAC y el ACE fueron los analitos que presentaron mayor absorbancia, mientras que la FEN, CYC y ASP fueron los de menor.



4.2 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA (CE-LVSS)

Considerando la baja concentración de edulcorantes que se espera encontrar en las muestras de interés se buscó incrementar la sensibilidad obtenida mediante el sistema CE-UV, realizando la optimización del sistema de preconcentración en línea *large volume sample stacking* (LVSS) mediante electroforesis capilar, incrementando así las ventajas del método de bajo costo (CE-LVSS).

Para la optimización del sistema CE-LVSS se consideraron los principios de la técnica a utilizar; en donde una muestra de baja conductividad es inyectada en el sistema electroforético de manera hidrodinámica hasta un 98% de la capacidad del capilar, posteriormente bajo la aplicación de un voltaje en polaridad inversa se busca la preconcentración de los analitos presentes en la muestra al inicio del capilar mientras la matriz es eliminada (*stacking*). Finalmente, la polaridad del sistema regresa a la normalidad y se lleva a cabo el análisis de los analitos preconcentrados mediante las condiciones óptimas obtenidas en el sistema electroforético convencional (Puig et al., 2008).

De acuerdo, con lo descrito anteriormente es necesario evaluar variables importantes para el desarrollo y efectividad de la técnica de preconcentración como son, el tiempo de inyección de muestra dentro del capilar, así como el voltaje aplicado y el tiempo correspondiente al proceso de *stacking*. Para lograr la optimización se realizaron experimentos por método univariante.



4.2.1 VOLUMEN DE INYECCIÓN DE MUESTRA

La inyección de la muestra dentro del capilar es un factor determinante para el proceso de *stacking*; entre mayor volumen de muestra sea inyectado se podrá incrementar y mejorar el factor de preconcentración. Es importante mencionar que, para que pueda llevarse a cabo el proceso de *stacking*, es necesario que el volumen de muestra no sobrepase el 98% del volumen total del capilar ya que debe existir ES dentro del mismo para garantizar que exista movilidad electroforética dentro del sistema y los analitos puedan ser acarreados a la interface entre el electrolito soporte y la matriz de la muestra (Chen et al., 2012; 2013).

Para este estudio se evaluaron diferentes tiempos de inyección en un intervalo de 30 a 240 segundos, con presiones de inyección que variaron entre 0.5 y 1.5 psi. De acuerdo con la literatura consultada, la señal analítica tiende a incrementar conforme el tiempo de inyección incrementa ya que se genera mayor preconcentración al tener más analito. Sin embargo, durante los experimentos realizados, se observó que a tiempos de inyección mayores a 60 s y 0.5 psi se obtiene deterioro en las señales analíticas correspondientes a los analitos. Así mismo, se observa que existe pérdida de los mismos al llenar por completo el capilar, evitando así que exista movilidad suficiente para la separación. Es por ello, que se seleccionan 60 s a 0.5 psi como mejor tiempo y presión de inyección respectivamente.

Para corroborar que efectivamente se estaba inyectando un volumen de muestra adecuado para la aplicación de LVSS, se calculó dicho volumen mediante la ecuación 1 (*Hagen-Poiseuille*), así como el volumen total del capilar mediante la fórmula para calcular el volumen de un cilindro (ecuación 2).

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L}$$

Ecuación 1. *Hagen-Poiseuille*



Donde, V es el volumen de inyección de muestra, L es la longitud total del capilar, η representa la viscosidad del solvente, ΔP es la diferencia de presión entre el inicio y el final del capilar, d es el diámetro interno del capilar (I.D.) y t es el tiempo de inyección (en segundos) (Vuorensola et al., 2002).

$$V = \pi r^2 h$$

Ecuación 2. Volumen de un cilindro

Donde, V es el volumen del cilindro, r es el radio y h representa la altura del mismo.

De acuerdo a estas ecuaciones se encontró que el volumen de inyección de la muestra bajo las condiciones seleccionadas como óptimas, es de 3.84 nL de un volumen total del capilar de 1.84 μ L, con lo que se asegura la presencia de ES dentro del sistema electroforético y por lo tanto, movilidad electroforética para poder llevar a cabo la preconcentración de los analitos.

4.2.2 TIEMPO Y VOLTAJE DE PRECONCENTRACIÓN

Una vez que el capilar ha sido inyectado con la solución matriz, se procede con el proceso de *stacking*, en donde los analitos se preconcentrarán en una pequeña región del capilar. Para ello es necesario aplicar un voltaje negativo, es decir, en sentido inverso durante un periodo de tiempo determinado. En este sentido, se evaluaron voltajes que iban de -6 kV hasta -12 kV en tiempos de 30 a 240 s.

Al realizar la evaluación de los diferentes tiempos y voltajes de *stacking*, se pudo observar que en ocasiones el tiempo o el voltaje eran tan altos que provocó que los analitos fueran total o parcialmente expulsados del capilar hacia el reservorio de ES.



De acuerdo a lo observado en los experimentos realizados (Figura 15), en ocasiones se podía obtener elevados factores de preconcentración en los analitos con menor movilidad electroforética y pérdida en los de mayor movilidad.

Por lo tanto, se optó por considerar como condiciones óptimas de preconcentración aquellas que permitieran obtener el máximo factor de preconcentración de los 5 analitos, evitando así la pérdida de alguno de ellos. Con base en lo anterior, se eligieron como condiciones óptimas de *stacking* -8 kV durante 60 s.

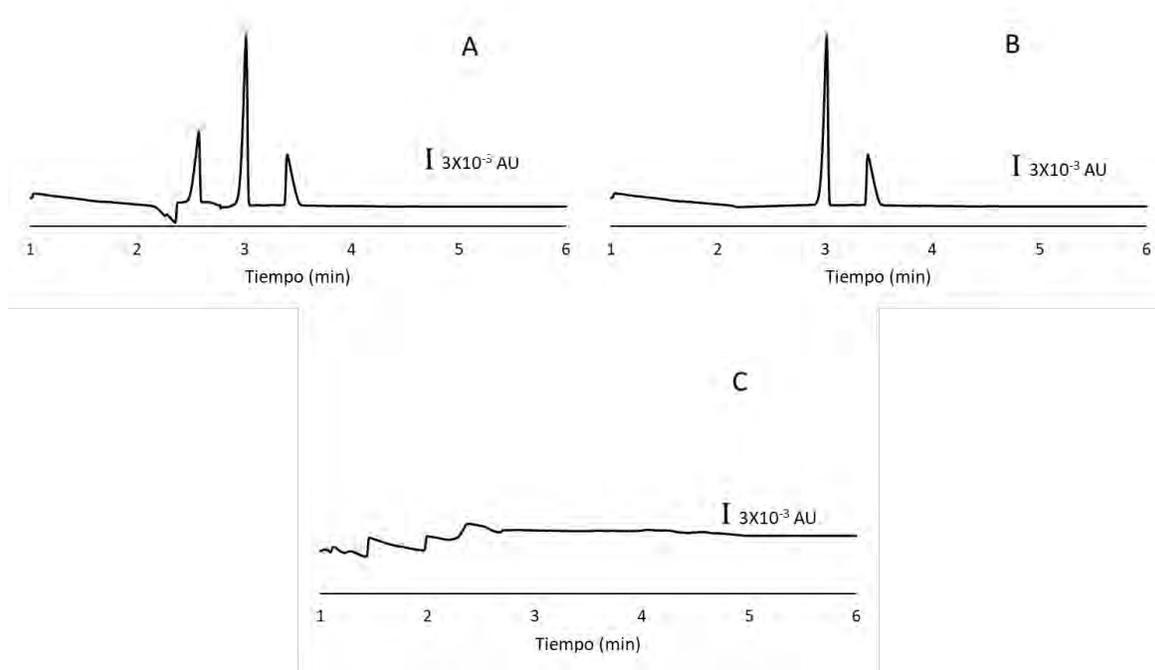


Figura 17. Electroferogramas obtenidos de la evaluación de las condiciones de preconcentración: A) 90 s de inyección a 0.5 psi, 120 s y -6.0 kV de *stacking*, B) 60 s de inyección a 0.5 psi, 120 s y -8.0 kV de *stacking*, C) 180 s de inyección a 0.5 psi, 60 s y -12.0 kV de *stacking*. Analizados bajo las condiciones óptimas de separación: ES de boratos (5mM) y benzoato (0.5 mM), a 18 kV y $\lambda=215$ nm.

4.3 OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LOS SISTEMAS CE-UV Y CE-LVSS

Conforme las condiciones óptimas para la detección de edulcorantes artificiales mediante CE-UV y CE-LVSS descritas anteriormente, se construyeron curvas de calibrado manteniendo la relación 1:5 entre ellos (SAC, ACS: CYC, FEN, ASP). El intervalo de trabajo fue de 1.0 a 50.0 mg L⁻¹ (EI a 5.0 mg L⁻¹) y 0.01 mg L⁻¹ a 2 mg L⁻¹ (EI a 0.15 mg L⁻¹) para los sistemas de CE-UV y CE-LVSS, utilizando como EI ácido pícrico a las concentraciones correspondientes. Los resultados obtenidos de dichas curvas de calibrado, se muestran en la Tabla 7. Para obtener los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) se siguió las recomendaciones de la IUPAC, que indican que el LOD debe ser 3.29 veces mayor que la relación señal ruido en el sistema. Siguiendo las mismas recomendaciones se calculó el LOQ considerando que este debe de tener un valor 3.0 veces mayor que el LOD.

Con la finalidad de evaluar la precisión y exactitud de los sistemas de detección desarrollados se realizaron análisis de reproducibilidad y repetitividad tanto para áreas como tiempos de migración de los analitos, evaluados a dos niveles de concentración. A partir del análisis por triplicado (n=3) de soluciones patrón que contenían a los analitos de interés a concentraciones conocidas, se calcularon los %DER mediante la determinación de la media y la desviación estándar de los análisis realizados. Se obtuvo en todos los casos %DER menores al 10% (Tabla 7), que de acuerdo con las concentraciones de trabajo son los adecuados.



Tabla 7. Parámetros analíticos de los sistemas CE-UV y CE-LVSS

Parámetros analíticos del Sistema CE-UV														
Edulcorante	Pendiente $b_1 \pm ts(b_1)$	Ordenada $b_0 \pm ts(b_0)$	r^{2a}	Intervalo lineal (mg L^{-1})	%DER Repetitividad ^b				%DER Reproducibilidad ^b				LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
					^b 10 mg L^{-1}		^b 20 mg L^{-1}		^b 10 mg L^{-1}		^b 20 mg L^{-1}			
					^c 50 mg L^{-1}		^c 100 mg L^{-1}		^c 50 mg L^{-1}		^c 100 mg L^{-1}			
					%DER _A	%DER _t	%DER _A	%DER _t	%DER _A	%DER _t	%DER _A	%DER _t		
FEN	0.380 ± 0.014	-0.151 ± 0.064	0.994	4.55 - 50	6.36 ^c	8.27 ^c	6.20 ^c	7.48 ^c	5.79 ^c	6.08 ^c	6.54 ^c	7.21 ^c	4.55	13.65
ASP	0.188 ± 0.005	-0.027 ± 0.024	0.997	3.51 - 50	4.84 ^c	7.42 ^c	5.28 ^c	6.15 ^c	6.75 ^c	7.84 ^c	5.35 ^c	6.03 ^c	3.51	10.54
CYC	0.019 ± 0.001	-0.012 ± 0.006	0.990	8.31 - 50	5.19 ^c	4.95 ^c	4.99 ^c	5.34 ^c	8.83 ^c	9.59 ^c	7.98 ^c	8.64 ^c	8.31	24.94
SAC	1.787 ± 0.050	-0.092 ± 0.045	0.997	0.68 - 10	3.90 ^b	4.58 ^b	3.35 ^b	4.29 ^b	4.42 ^b	5.13 ^b	3.53 ^b	4.37 ^b	0.68	2.03
ACE	0.857 ± 0.028	-0.033 ± 0.025	0.996	0.78 - 10	5.86 ^b	3.14 ^b	2.08 ^b	3.33 ^b	6.29 ^b	5.89 ^b	5.85 ^b	7.04 ^b	0.78	2.33

Parámetros analíticos del Sistema CE-LVSS														
Edulcorante	Pendiente $b_1 \pm ts(b_1)$	Ordenada $b_0 \pm ts(b_0)$	r^{2a}	Intervalo lineal (mg L^{-1})	%DER Repetitividad ^b				%DER Reproducibilidad ^b				LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
					^b 0.04 mg L^{-1}		^b 0.12 mg L^{-1}		^b 0.04 mg L^{-1}		^b 0.12 mg L^{-1}			
					^c 0.2 mg L^{-1}		^c 0.6 mg L^{-1}		^c 0.2 mg L^{-1}		^c 0.6 mg L^{-1}			
					%DER _A	%DER _t								
FEN	0.749 ± 0.020	-0.012 ± 0.038	0.997	0.15 - 2.0	2.84 ^c	3.87 ^c	2.30 ^c	3.08 ^c	7.89 ^c	9.11 ^c	7.96 ^c	7.68 ^c	0.05	0.15
ASP	0.219 ± 0.006	0.019 ± 0.027	0.997	0.36 - 2.0	6.59 ^c	8.07 ^c	4.90 ^c	4.75 ^c	8.15 ^c	8.08 ^c	6.17 ^c	8.34 ^c	0.12	0.36
CYC	0.070 ± 0.002	-0.029 ± 0.011	0.995	0.54 - 2.0	2.85 ^c	3.91 ^c	3.60 ^c	4.02 ^c	4.07 ^c	5.36 ^c	9.45 ^c	7.60 ^c	0.18	0.54
SAC	2.347 ± 0.107	-0.122 ± 0.067	0.992	0.08 - 0.4	2.14 ^b	3.45 ^b	4.39 ^b	5.53 ^b	7.77 ^b	6.40 ^b	8.97 ^b	5.21 ^b	0.03	0.08
ACE	1.145 ± 0.048	0.017 ± 0.045	0.991	0.11 - 0.4	4.19 ^b	4.73 ^b	3.98 ^b	3.49 ^b	3.39 ^b	3.10 ^b	9.10 ^b	6.04 ^b	0.04	0.11

%DER_t desviación estándar relativa de los tiempos de migración, %DER_A desviación estándar relativa de las áreas.
^aCoficiente de determinación. Niveles de concentración (repetitividad y reproducibilidad, %DER, n=3) (^bCE-UV; 10 mg L^{-1} y 20 mg L^{-1} , ^cCE-UV; 50 mg L^{-1} y 100 mg L^{-1} , ^bLVSS-CZE; 0.04 mg L^{-1} y 0.12 mg L^{-1} , ^cLVSS-CZE; 0.2 mg L^{-1} y 0.6 mg L^{-1})

Con base en los resultados mostrados se observa que los LOD obtenidos tienden a variar, entre los analitos y esto se debe a que la absorbancia no es la misma para todos, dificultando así la detección multianalito. Por lo que, no se puede mejorar los LOD de los más sensibles sin comprometer la detección de los otros.

4.3.1 COMPARACIÓN CE-UV vs CE-LVSS

Con los resultados obtenidos a partir de las curvas de calibrado para ambos sistemas desarrollados, se calcularon los factores de enriquecimiento (de acuerdo a los LOD) proporcionados por la técnica de preconcentración en línea, para lo cual se calculó el cociente entre el LOD del sistema CE-UV y el LOD del sistema CE-LVSS. Los resultados finales (Tabla 8), muestran que se lograron obtener factores de enriquecimiento que van desde 20.51 hasta 89.44, lo cual se puede apreciar en la Figura 14.

Tabla 8. Factores de enriquecimiento obtenidos

Edulcorante artificial	Factor de enriquecimiento
FEN	89.44
ASP	27.92
CYC	46.36
SAC	26.42
ACE	20.51

Para determinar si existía diferencia significativa entre los dos métodos desarrollados en el presente trabajo, se realizaron pruebas estadísticas como el *test t de student* para datos emparejados, evidenciando que sí existe diferencia significativa entre los métodos presentando una t_{cal} de 2.51 mayor a la t_{crit} de 2.13 de acuerdo al nivel de significancia (95%) y los grados de libertad correspondientes (n-1). Adicionalmente se realizaron análisis con el *test t de student* para la comparación entre la sensibilidad analítica de las curvas de calibrado obtenidas para cada edulcorante por ambos métodos, encontrando en todos los



casos que la $t_{cal} > t_{crit}$, utilizando un nivel de significancia del 95% y los grados de libertad correspondientes a cada una de las curvas de calibrado $((n_1-2) + (n_2-2))$.

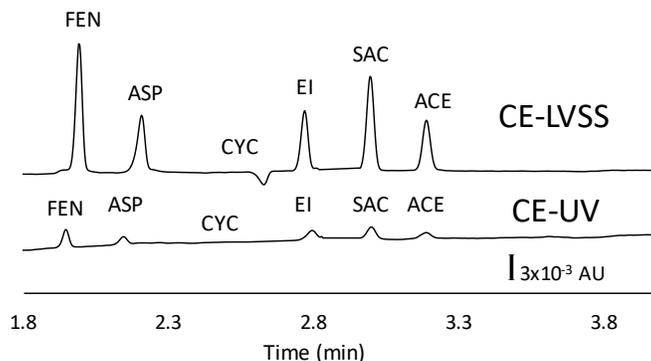


Figura 18. Electroferogramas correspondientes al análisis de una solución a 1 mg L^{-1} de ácido pícrico (EI), ACS-K y SAC; 5 mg L^{-1} FEN, ASP y CYC. Analizada a 18 kV y $\lambda=215 \text{ nm}$, con ES de boratos (5 mM) y benzoato (0.5 mM) por ambas metodologías.

Como se observa en la Figura 18, y con base en los datos estadísticos el método desarrollado CE-LVSS es significativamente más sensible que el método tradicional CE-UV.

4.4 APLICACIÓN A MUESTRAS DE AGUA

Al tener desarrollada la metodología CE-LVSS para el análisis de edulcorantes en bajas concentraciones, se prosiguió a evaluar y validar el uso de la misma en muestras reales de agua. Para esta etapa fue necesario considerar posibles diferencias entre las matrices de agua que se adquirieron de diferentes tipos de origen, como: agua de grifo de diversas colonias de la ciudad de Pachuca, Hgo., aguas preenvasadas compradas en un mismo autoservicio, muestras de agua de manantial proporcionadas para este estudio, aguas obtenidas de purificadoras de agua potable, y aguas a granel de acuerdo con la clasificación de aguas establecida por la NOM-201-SSA1-2002.



Las muestras formaron un total de 20, partiendo de 7 muestras de agua preenvasada, 7 muestras de agua de grifo, 4 muestras de agua a granel y 2 de agua de manantial. Debido a que las muestras son de diferente origen, tienen por consiguiente diferentes características y propiedades. Para fines de este estudio, el objetivo fue homogenizar las muestras en cuestión de conductividad, para lo cual se consideró utilizar un proceso de extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) como método de limpieza para así eliminar sales y compuestos presentes en las muestras que pudieran provocar algún inconveniente debido a alta conductividad durante el implemento de la técnica de preconcentración en línea desarrollada (Ordóñez et al., 2012).

Este proceso de limpieza se llevó a cabo en cuatro etapas (Figura 19) con cartuchos Discovery C₁₈ de 500 mg para realizar extracción en fase reversa, que como ha sido reportado por Ordóñez y colaboradores, presenta mejores rendimientos que la extracción mixta e incluso es mejor que la extracción por intercambio iónico.

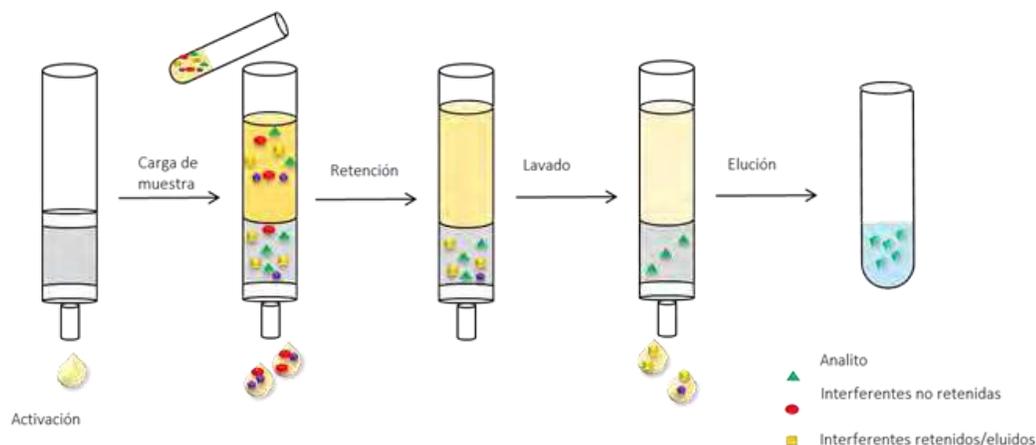


Figura 19. Diagrama del proceso de limpieza de muestras mediante cartucho de SPE.

Se comenzó con la activación del cartucho mediante el uso de 5 mL de MeOH y posteriormente 5 mL de agua desionizada, mientras que para la extracción se tomó 1 mL de muestra que fue fortificada con EI en una concentración de $150 \mu\text{g L}^{-1}$, para ser aforado a un volumen final de 10 mL con agua desionizada y posteriormente pasar el volumen total



por el cartucho de extracción previamente activado. Como siguiente paso se llevó a cabo el lavado del cartucho con 2 mL de una solución de MeOH al 5.0% (v/v) para eliminar interferentes. Finalmente, se eluyeron los analitos de interés utilizando 2 mL de MeOH a un flujo de 1 mL min^{-1} . La solución que contenía a los analitos se evaporó a sequedad a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ en corriente de aire. Por último, se reconstituyó con 1 mL de agua desionizada para ser analizados por CE-LVSS mediante las condiciones óptimas ya establecidas previamente.

4.4.1 RESULTADOS

Los resultados presentados fueron obtenidos mediante el análisis por triplicado de cada una de las muestras, calculando las concentraciones de las señales analíticas mediante interpolación en la curva de calibrado del sistema CE-LVSS, así como las DER de cada una de las mediciones. Para asegurar que la señal analítica correspondiera al edulcorante respectivo, se realizó la adición de una mayor concentración del mismo dentro de la muestra y se observó un aumento en la señal correspondiente (Figura 20).

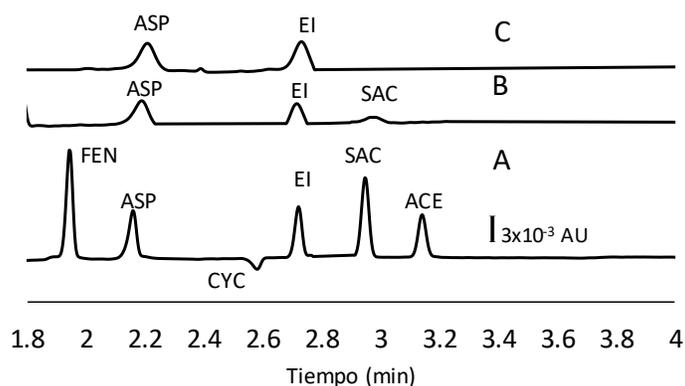


Figura 20. Electroferogramas correspondientes a dos muestras reales diferentes comparadas con A) una solución estándar analizada por LVSS, en el caso de la primera (15B) no fue necesario hacer uso del proceso de limpieza con SPE, mientras que en la segunda (15C) se realizó la limpieza con SPE. Análisis mediante el sistema CE-LVSS; 1 min inyección durante 60 s, 1 min de stacking a -8 kV , 215 nm , 18 kV .



Las concentraciones encontradas en cada una de las 8 muestras positivas a al menos un edulcorante artificial se muestran en la Tabla 9, así como sus respectivas DER.

Tabla 9. Resultados en muestras de agua

Muestra\Edulcorante		ASP (mg L ⁻¹) (DER)	SAC (mg L ⁻¹) (DER)	ACE (mg L ⁻¹) (DER)
Agua preenvasada	Muestra 1	<LOD	<LOD	<LOD
	Muestra 2	0.37 (1.72)	<LOD	<LOD
	Muestra 3	0.65 (2.13)	<LOD	<LOD
	Muestra 4	0.74 (2.33)	0.08 (2.96)	<LOD
Agua a granel	Muestra 1	0.19 (2.89)	<LOD	0.08 (2.63)
	Muestra 2	0.32 (3.58)	<LOD	<LOD
Agua de grifo	Muestra 1	0.23 (2.86)	<LOD	<LOD
	Muestra 2	0.76 (3.43)	<LOD	<LOD
Agua de manantial	Muestra 1	0.49 (1.14)	<LOD	<LOD

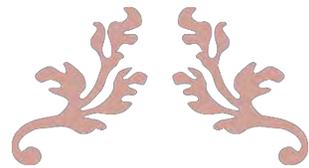
Como se observa en los resultados obtenidos, el ASP fue el edulcorante encontrado en los 4 tipos de muestra de agua en concentraciones que varían desde 0.19 a 0.76 mg L⁻¹, demostrando que es un contaminante de medios acuosos altamente utilizado y desechado actualmente. Por otro lado, SAC y ACE sólo fueron encontrados en concentraciones mayores a sus correspondientes LOD en una sola muestra de agua preenvasada y agua a granel respectivamente.

La presencia de este tipo de contaminantes en las muestras analizadas debería ser objeto de estudio para fomentar la regulación del uso y eliminación de los mismos, ya que actualmente en México no existe legislación alguna que establezca límites permisibles en aguas de consumo humano y/o aguas superficiales. Esto promueve el consumo indirecto de edulcorantes artificiales en productos como el agua preenvasada y a granel que no deberían de contenerlos, y que además podrían afectar en algún momento la salud del consumidor



Otros estudios para la detección de edulcorantes artificiales en diferentes muestras de agua como el de Tran y col. (2014) y Ordoñez y col. (2012) demuestran que este tipo de compuestos se encuentran contaminando medios acuáticos alrededor del mundo. Los resultados obtenidos por Tran y col. (Tabla 3) varían entre los LOD (entre 3 y 10 ng L⁻¹) hasta 3210 ng L⁻¹ en términos de concentración de SAC, por ejemplo. Sin embargo, para lograr obtener estos resultados se recurrió al uso de una técnica de preconcentración por cartucho de SPE utilizando 500 mL de muestra y analizando las soluciones obtenidas por HPLC-MS/MS. Este método desarrollado tiene alta sensibilidad sobre todo por el implemento de la técnica de preconcentración junto con el detector utilizado (MS/MS), pero debido al alto costo de este no todos los laboratorios cuentan con uno. Por ello es importante el desarrollo de metodologías que permitan el análisis multianalito de edulcorantes artificiales, consumiendo bajos volúmenes de muestra, que sean de fácil acceso para los laboratorios y que permitan la determinación de concentraciones traza y ultrataza sin la necesidad de utilizar detectores muy especializados.





CONCLUSIONES



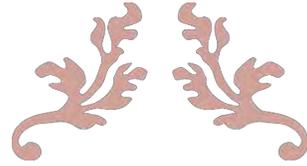
5 CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas de separación y análisis simultáneo de edulcorantes artificiales mediante CE-UV fueron: electrolito soporte de boratos (5 mmol L^{-1}) y benzoato (0.5 mmol L^{-1}) ajustado a pH 9.0, aplicando un voltaje de 18 kV y a una longitud de onda de 215 nm.
- Las condiciones óptimas de preconcentración en línea simultánea de edulcorantes artificiales mediante CE-LVSS fueron: inyección hidrodinámica durante 60 s a 0.5 psi, 60 s de *stacking* aplicando un voltaje de -8 kV.
- Las metodologías electroforéticas propuestas permiten una buena separación, identificación y preconcentración de los analitos de interés proporcionando rapidez, reproducibilidad y linealidad, para el análisis de edulcorantes artificiales. El método de preconcentración en línea CE-LVSS logró incrementar la sensibilidad analítica hasta 89 veces con respecto a los límites de detección obtenidos por el método CE-UV.
- El método propuesto para la separación y determinación de edulcorantes artificiales por CE-LVSS tiene diversas ventajas con respecto a otras metodologías desarrolladas como: reducción en tiempo de análisis, bajo consumo de muestra y detección de concentraciones en el orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ aún con detector de UV-Vis, convirtiéndola en una técnica aplicable en el análisis de estos compuestos presentes bajas concentraciones en muestras de agua.



- Con base en los resultados del análisis de muestras de agua preenvasada, a granel, de grifo y de manantial, se obtiene que el ASP es el edulcorante más encontrado en muestras de agua, al detectarse en los 4 tipos de muestras analizadas, esto concuerda con su abundante uso en la actualidad. Por otro lado, sólo se encontraron SAC y ACE en una muestra de agua preenvasada y agua a granel, respectivamente.
- Ya que no existe legislación alguna que regule el uso y desecho de este tipo de contaminantes se sugiere que se preste atención a los mismos como objeto de futuros estudios.





REFERENCIAS



6 REFERENCIAS

Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., Barcelò, D. **Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy.** Science of the Total Environment 438, (2012), 15-25.

Álvarez G.A., Lozada S.M. Rodríguez J.A., Galán C.A., Páez M.E. **Potentiometric quantification of saccharin by using a selective membrane formed by pyrrole electropolymerization.** Food Chemistry 120, (2010), 1250-1254.

Álvarez-Llamas G., Rodríguez-Cea A., Fernández de la Campa M.R., Sanz-Medel A. **Large volume sample stacking capillary electrophoresis for metallothioneins analysis in eel liver.** Analytica Chimica Acta 486, (2003), 183-190.

Alves R.N., Maulvault A.L., Barbosa V.L., Cunha S., Kwadijk J.A.F., Álvarez-Muñoz D., Rdríguez-Mozaz S., Aznar O. **Preliminary assessment on the bioaccessibility of contaminants of emerging concern in raw and cooked seafood.** Food and Chemical Toxicology 104, (2017), 69-78.

Arbeláez P., Borrull F., Pocurull E., Marcé R. M. **Determination of high intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A 1393, (2015), 106-114.

Bai X., Lutz A., Carroll R., Keteles K., Dahlin K., Murphy M., Nguyen D. **Occurrence, distribution and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds.** Chemosphere 200, (2018), 133-142.

Baquero, F., Martínez, J., Cantón, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water**



- environments.** Current Opinion in Biotechnology 19, 3, (2008), 260-265.
- Barbosa, M.O., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T. **Eco-friendly LC–MS/MS method for analysis of multi-class micropollutants in tap, fountain, and well water from Northern Portugal.** Analytical and Bioanalytical Chemistry 408, (2016), 8355–8367.
- Barraza, L. **A new approach for regulating bisphenol A for the protection of the public's health.** The Journal of Law, Medicine & Ethics 41 (s1), (2013), 9-12.
- Barriada-Pereira M., Serodio P., González-Castro M.J., Nogueira J.M.F. **Determination of organochlorine pesticides in vegetable matrices by stir bar sorptive extraction with liquid desorption and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry towards compliance with European Union directives.** Journal of Chromatography A 1217, (2010), 119-126.
- Batt A. L., Furlong E. T., Mash H. E., Glassmeyer S. T., Kolpin D. W. **The importance of quality control in validating concentrations of contaminants of emerging concern in source and treated drinking water samples.** Science of the Total Environment 579, (2017), 1618-1628.
- Benson R., Conerly O. D., Sander W., Batt A. L., Boone J. S., Furlong E. T., Glassmeyer S. T., Kolpin D. W., Mash H. E., Schenck K. M., Simmons J. E. **Human health screening and public health significance of contaminants of emerging concern detected in public water supplies.** Science of the Total Environment 579, (2017), 1643-1648.
- Bergamo A.B., Fracassi J.A., Pereira D. **Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection.** Food Chemistry 124, (2011), 11714-1717.



- Bergheim, M., Gminski, R., Spangenberg, B., Debiak, M., Bürkle, A., Mersch-Sundermann, V., Kümmerer, K., Gieré, R. **Recalcitrant pharmaceuticals in the aquatic environment: a comparative screening study of their occurrence, formation of phototransformation products and their in vitro toxicity.** Environmental Chemistry 11, 4, (2014), 431-444.
- Beyer A., Biziuk M. **Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food.** Food Chemistry 108, (2008), 669-680.
- Boyd G.R., Palmeri J.M., Zhang S., Grimm D.A. **Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA.** Science of the Total Environment 333 (1), (2004), 137-148.
- Brezovšek, P., Eleršek, T., Filipič, M. **Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga Pseudokirchneriella subcapitata and the cyanobacterium Synechococcus leopoliensis.** Water Research 52, (2014),168-177.
- Bronaugh R.L., Yourick J.J., Havery D.C. **Dermal exposure assessment for the fragrance musk xylol.** Proceedings of the Society of Toxicology Annual Meeting 274, (1998)
- Cantarelli M.A., Pellerano R.G., Marchevsky E.J., Camiña J.M. **Simultaneous determination of Saccharine and Aspartame in Commercial Noncaloric Sweeteners using the PLS-2 Multivariate Calibration Method and Validation by Capillary Electrophoresis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, (2008), 9345-9349.
- Carloni J., Oppermann A., Nasser A.L., Rediogolo H., De Oliveira J.E., Bladimirov C., Pezza L. **Potenciometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a**



- silver electrode.** Food Chemistry 83, (2003), 297-301.
- Castiglioni S., Davoli E., Riva F., Palmiotto M., Camporini P., Manenti A., Zuccato E. **Data on occurrence and fate of emerging contaminants in a urbanized area.** Data in Brief 17, (2018), 533-543.
- Chen Q., Wang J. **Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography.** Journal of Chromatography A 937, (2001), 57-64.
- Chen F.P., Chien M.H. **Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells.** Climacteric: The Journal of the International Menopause Society 17, (2014), 377-384.
- Chen Y., Lü W., Chen X., Teng M. **Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis.** Central European Journal of Chemistry. 10, (2012), 611-638.
- Cheng C., Li X., Xie X., Chang F., Li M., Zhu Z. **Highly sensitive detection of cooper (I) and cooper (II) in cells specimens by CE-UV with a large-volume sample stacking.** Analytical Methods 8, (2016), 4272-4276.
- Chou Y.Y., Huang P.C., Lee C.C., Wu M.H, Lin S.J. **Phthalate exposure in girls during early puberty.** Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 22, (2009), 69-77.
- Colin, A., Bach, C., Rosin, C., Munoz, J.F., Dauchy, X. **Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France?** Archives of Environmental Contamination and Toxicology 66 (1), (2014), 86-99.



- Conacher, H. B. S., & O'Brien, R. C. **Gas-liquid chromatographic determination of cyclamic acid**. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 54 (5), (1971), 1135-1137.
- Daughton, C.G., Ternes, A.T. **Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?** Environmental Health Perspectives 107 (Suppl 6), (1999), S907-S938.
- Di Prieta A., Cavrini V., Bonazzi D., Benefenati L. **HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations**. Chromatographia 30 (3/4), (1990), 215-219.
- Dodds, C.E., Lawson, W., 1938. **Molecular structure in relation to estrogenic activity compounds without a phenanthrene nucleus**. Proceedings of the Royal Society of London B 125, (1938), 222-232.
- Dossi N., Toniolo R., Susmel S., Pizarello A., Bontempelli G. **Simultaneous RPLC determination of additives in soft drinks**. Chromatographia 63, (2006), 557-562.
- Elceman A. G., Hill H. H. Jr. and Davani B. **Gas Chromatography**. Analytical Chemistry 66, (1994), 621R-633R.
- Elmosallamy M.A., Ghoneim M.M., Killa H.M., Saber A.L. **Potentiometric membrane sensor for determination of saccharin**. Microchimica Acta 151, (2005), 109-113.
- Farajzadeh M.A., Asghari A., Feriduni B. **An efficient, rapid and microwave-accelerated dispersive liquid-liquid microextraction method for extraction and preconcentration of some organophosphorus pesticide residues from aqueous samples**. Journal of Food Composition and Analysis 48, (2016), 73-80.



- Fischer A., Laak T., Bronders J., Desmet N., Christoffels E., Van Wezel A., Van der Hoek J.P. **Decision support for water quality management of contaminants of emerging concern.** Journal of Environmental Management 193, (2017), 360-372.
- Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E. **A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States dII) Untreated drinking water sources.** Science of the Total Environment 402 (2), (2008), 201-216.
- Frazier R.A., Inns E.L., Dossi N., Ames J.M, Nursten H.E. **Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks.** Journal of Chromatography A 876, (2000), 213-220.
- Furlong, E.T., Batt, A.L., Glassmeyer, S.T., Noriega, M.C., Kolpin, D.W., Mash, H., Schenck, K.M. **Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States: pharmaceuticals.** Science of the Total Environment 579, (2017), 1629–1642.
- Gago-Ferrero, P., Diaz-Cruz, M.S., Barcelo, D. **Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants.** Chemosphere 84 (8), (2011), 1158-1165.
- García-Galán, M.J., González Blanco, S., López Roldán, R., Díaz-Cruz, S., Barcelò D. **Ecotoxicity evaluation and removal of sulfonamides and their acetylated metabolites during conventional wastewater treatment.** Science of the Total Environment 437, (2012), 403-412.



- Giokas, D.L., Salvador, A., Chisvert, A. **UV filters: from sunscreens to human body and the environment.** Trends in Analytical Chemistry 26, (2007) 360-374.
- Gogoi A., Mazumber P., Tyagi V. K., Chaminda T., An A. K., Kumar M. **Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review.** Groundwater for Sustainable Development 6, (2018), 169-180.
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S. **Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S.** Toxicology in Vitro 26 (5), (2012), 727-731.
- Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M., Smyth, S.A. **Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes.** Science of the Total Environment 473, (2014), 235-243.
- Harris D.C. **Análisis químico cuantitativo.** Editorial Reverté. 3ª Edición (2010), 654-658
- Hashemi M., Habibi A., Jahanshahi N. **Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas-chromatography flame-ionisation detection.** Food Chemistry 124, (2011), 1258-1263.
- Hashemi B., Zohrabi P., Kim K.-H., Shamsipur M., Deep A., Hong J. **Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants.** Trends in Analytical Chemistry 97, (2017), 83-95.
- Herrero M., García-Cañas V., Simo C. and Cifuentes A. **Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and foodomics. Review.** Electrophoresis 31, (2010), 205-228.



- Hird, S.J.; Lau, B.P-Y.; Schuhmaher, R. and Krska, R. **Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food.** Trends in Analytical Chemistry 59, (2014), 59-72.
- Hsieh T.H., Tsai C.F., Hsu C.Y., Kuo P.L, Lee J.N., Chai C.Y., Wang S.C., Tsai E.M. **Phthalates induce proliferation and invasiveness of estrogen receptornegative breast cancer through the AhR/HDAC6/c-Myc signaling pathway.** Federation of American Societies for Experimental Biology 26, (2012), 778-787.
- International Food Information Council Foundation (IFIC) Review. **Low-calorie sweeteners and health.** Washington, Estados Unidos, (2009).
- Jelić A., Gros M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., Ventura F., Petrovic M., Barcelo, D. **Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment.** Water Research 45 (3), (2011), 1165-1176.
- Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., Yin, D. **Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China.** Science of the Total Environment 458, (2013), 267-272.
- Kang S.C., Lee B.M. **DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates.** Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 68, (2005), 1995-2003.
- Kawai T., Koino H., Sueyoshi K., Kitagawa F., Otsuka K. **Highly sensitive chiral analysis in capillary electrophoresis with large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump.** Journal of Chromatography A 1246, (2012), 28-34.
- Kawai T., Ota N., Imasato A., Shirasaki Y., Otsuka K., Tanaka Y. **Profiling of N-linked glycans**



- from 100 cells by capillary electrophoresis large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking.** Journal of Chromatography A 1565, (2018), 138-144.
- Kim I. Y., Han S.Y, Moon A. **Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells.** Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 67, (2004), 2025-2035.
- Kirgöz U.A., Odaci D., Timur S., Merkoçi A., Alegret S., Besün N., Telefoncu A. **A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection.** Analytica Chimica Acta 570, (2006), 165-169.
- Kirschner M.E. **Boomers quest for agelessness.** Chem. Eng. News 75 (16), (1997), 19-25.
- Kitagawa F., Otsuka K. **Review. Recents applications of on-line sample preconcentración techniques in capillary electrophoresis.** Journal of Chromatography A 1335, (2014), 43-60.
- Krishnan V.A., Starhis P., Permuth F.S., Tokes L., Feldman D. **Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flask during autoclaving.** Endocrine 132, (1993), 2279-2286.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance.** Environmental Science & Technology 36 (6), (2002) 1202-1211.
- Kubwabo C., Rasmussen P.E, Fan X., Kosarac I., Wu F., Zidek A., Kuchta S.L. **Analysis of selected phthalates in Canadian indoor dust collected using household vacuum and**



standardized sampling techniques. Indoor air 23, (2013), 506-514.

Kubwabo C., Stewart B., Zhu J., Marro L. **Occurrence of perfluorosulfonates and other perfluorochemicals in dust from selected homes in the city of Ottawa, Canada.** Journal of Environmental Monitoring 7, (2005), 1074-1078.

Lakind J.S., Levesque J., Dumas P., Bryan S., Clarke J., Naiman D.Q. **Comparing United States and Canadian population exposures from National Biomonitoring Surveys: bisphenol A intake as a case study.** Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology 22, (2012), 219-226.

Lange F.T., Scheurer M., Brauch H.J. **Artificial sweeteners-a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review.** Analytical and Bioanalytical Chemistry 403, (2012), 2503-2518.

Lee I.S.L., Boyce M.C., Breadmore M.C. **Extraction and on-line concentration of flavonoids in Brassica oleracea by capillary electrophoresis using large volume sample stacking.** Food Chemistry 133, (2012), 205–211.

Li J., Huang Y., Huang L., Ye L., Zhou Z., Xiang G., Xu L. **Determination of imatinib mesylate and related compounds by field amplified sample stacking with large volume sample injection capillary electrophoresis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 70, (2012), 26–31.

Li W.C. **Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil.** Environmental Pollution 187, (2014), 193-201.

Lin Y.H., Chou S.S., Sheu F., Shyu Y.T. **Simultaneous determination of sweeteners and**



- preservatives in preserved fruits by micellar electrokinetic capillary chromatography.** Journal of Chromatographic Science 38, (2000), 345-352.
- Lin H., Oturan N., Wu J., Sharma V.K., Zhang H., Oturan M.A. **Removal of artificial sweetener aspartame from aqueous media by electrochemical advanced oxidation processes.** Chemosphere 167, (2017), 220-227.
- Llamas N.E., Di Niezo M.S., Palomeque M.E, Fernández B.S. **Direct determination os saccharin and acesulfame-K in sweeteners and fruit juices powders.** Food Analytical Methods 1, (2008), 43-48.
- Llorca M., Farré M., Picó Y., Müller J., Knepper T.P., Barceló D. **Analysis of perfluoroalkyl substances in waters from Germany and Spain.** Science of the Total Environment 431, (2012), 139-150.
- Ludwig N., Kusumoto T., Galindo C., Peaupardin P., Pin S., Renault J.-P., Muller D., Yamauchi T., Kodaira S., Barillon R., Raffy Q. **Radiolysis of phenylalanine in solution with Bragg-Peak energy protons.** Radiation Measurements 116, (2018), 55-59.
- Malinina J., Kamencev M., Tkach K., Yakimova N., Kuchumova I., Moskvina N. **Large-volume sample stacking for the analysis of low molecular mass amines in steam water by CE using novel highly absorbing probe for indirect UV detection.** Microchemical Journal 137, (2018), 208-213.
- Matsumoto A., Kunugita N., Kitagawa K., Isse T., Oyama T., Foureman G.L., Morita M., Kawamoto T. **Bisphenol A levels in human urine.** Environmental Health Perspectives. 111, (2003), 101-104.



- Murray S., Tulloch A., Criscitelli K., Avena N. M. **Review. Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: Relevance to low calorie sweeteners.** *Physiology and behavior* 164, (2016), 504-508.
- Morales M.L., Ferreira R., González A.G., Troncoso A.M. **Simultaneous determination of organic acids and sweeteners in soft drinks by ion-exclusion HPLC.** *Journal of separation science* 24, (2001), 879-884.
- Moreno-González D., Krulišová M., Gámiz-Gracia L., García-Campaña A.M. **Determination of tetracyclines in human urine samples by capillary electrophoresis in combination with field amplified sample injection.** *Electrophoresis* 39, (2018), 608-615.
- Mooradian A.D., Smith M., Tokuda M. **The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review.** *Clinical Nutrition ESPEN* 18, (2017), 1-8.
- Moore N.P. **The oestrogenic potential of the phthalate esters.** *Reproductive Toxicology* 14, (2000), 183-192.
- Ni Y, Xiao W, Kokot S. **A differential kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics.** *Food Chemistry* 113, (2009), 1339-1345.
- Núñez M., Borrull F., Pocurrul E., Fontanals N. **Sample treatment for the determination of emerging organic contaminants in aquatic organisms.** *Trends in Analytical Chemistry* 97, (2017)^a, 136-145.
- Núñez M., Borrull F., Pocurrull E., Fontanals N. **Pressurised liquid extraction and liquid**



- chromatography-high resolution mass spectrometry to determine high-intensity sweeteners in fish samples.** Journal of Chromatography A 1479, (2017)^b, 32-39.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002**, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.
- Odaci D., Timur S., Telefoncu A. **Carboxyl esterase-alcohol oxidase based Biosensor for the aspartame determination.** Food Chemistry 84, (2004), 493-496.
- Oliveira V.N.F, Bellozi L., Pereira J., Vincenzi A., Tonin F.G., Leal M.A. **Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection.** Analytical Methods. 5, (2013), 1524-1532.
- Olney J.W. **Brain tumors and artificial sweeteners? A lesson on not getting soured on epidemiology.** Medical and Pediatric Oncology 30, (1998), 7-8.
- Ordoñez E.Y., Quintana J.B., Rodil R., Cela R. **Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A 1256, (2012), 197-205.
- Ordoñez E.Y., Quintana J.B., Rodil R., Cela R. **Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A 1320, (2013), 10-16.
- Peng X., Yu Y., Tang C., Tan J., Huang Q., Wang Z. **Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China.** Science of the Total Environment 397 (1), (2008), 158-166.



Pereira J., Dolzan MD., Vitali L., Oliveira M.A., Micke G.M. **Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis.** Journal of Chromatography A 1396, (2015), 148-152.

Pérez C. R. **Estudio de validación de la Metodología para la determinación de Vitamina A en Alimentos infantiles instantáneos por Cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC)** Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 17 (2000), N.1-4.

Petrie B., Barden R., Kasprzyk-Hordern B. **A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring.** Water Research. 72, (2015), 3-27.

Puig P., Tempels F.W.A., Somsen G.W., de Jong J.G., Borrull F., Aguilar C., Calull M. **Use of large-volume sample stacking in on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis for improved sensitivity.** Electrophoresis 29, (2008), 1339–1346.

Rayne S., Forest K. **Perfluoroalkyl sulfonic and carboxylic acids: a critical review of physicochemical properties, levels and patterns in waters and wastewaters, and treatment methods.** Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 44, (2009), 1145-1199.

Riva F., Castligioni S., Fattore E., Manenti A., Davoli E., Zuccato E. **Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk.** International Journal of Hygiene and Environmental Health 221, (2018), 451-457.

Relić D., Popović A., ĐorCević D., Čáslavský J. **Occurrence of synthetic musk compounds in**



- surface, underground, waste and processed water samples in Belgrade, Serbia.** Environmental Earth Sciences 76 (3), (2017), 122.
- Roca-Saavedra P., Mendez-Vilabril V., Miranda JM., Nebot C., Cardelle-Cobas A., Franco CM., Cepeda A. **Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota-a review.** Journal of Physiology and Biochemistry 74, (2018) 69-83.
- Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. **Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain).** Chemosphere 86 (10), (2012), 1040-1049.
- Rodil, R., Quintana, J.B., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. **Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Analytical Chemistry 80, (2008), 1307-1315.
- Rutkowska M., Owczarek K., De la Guardia M., Plotka-Wasyłka J., Namiesnik J. **Application of additional factors supporting the microextraction process.** Trends in Analytical Chemistry 97, (2017), 104–119.
- Salas D., Borrul F., Fontanals N., Marcé RM. **Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters.** Analytical and Bioanalytical Chemistry 407, (2015), 4277-4285.
- Salvatierra-stamp V., Muñoz-Valencia R., Jurado J.M., Ceballos-Magaña S.G. **Hollow fiber liquid phase microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants in water samples.**



Microchemical Journal 140, (2018), 87-95.

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

Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. **Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout.** Aquatic Toxicology 68, (2004), 141-150.

Siddique S., Kubwabo C., Harris S.A. **A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in woman.** Emerging Contaminants 2, (2016), 204-219.

Simpson Jr. S.L., Quirino J.P., Terabe S. **Review. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications.** Journal of Chromatography A 1184, (2008), 504-541

Sohoni P., Sumpter P.J. **Several environmental estrogen are also endrogens.** Journal of Endocrinology 158, (1998), 327-339.

Stojkovic M., Mai T.D, Hauser P.C. **Determination of artificial sweeteners by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection optimized by hydrodynamic pumping.** Analytica Chimica Acta 787, (2013), 254–259.

Subedi, B., Balakrishna, K., Sinha, R.K., Yamashita, N., Balasubramanian, V.G., Kannan, K. **Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products, including psychoactive and illicit drugs and artificial sweeteners, in five sewage treatment plants**



- in India.** Journal of Environmental Chemical Engineering 3 (4), (2015), 2882-2891.
- Subedi, B., Lee, S., Moon, H.-B., Kannan, K. **Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea.** Environment International 68, (2014), 33-40.
- Taheran M., Naghdi M., Brar S. K., Verma M., Surampalli R. Y. **Emerging Contaminants: Here today, there tomorrow!** Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management 10, (2018), 122-126.
- Talib A., Randhir T. O. Managing emerging contaminants in watersheds: **Need for comprehensive, systems-based strategies.** Sustainability of Water Quality and Ecology 9-10, (2017), 1-8.
- Técnicas Cromatográficas.** Facultad de Química; Química Analítica Instrumental II. UNAM; http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf julio, 2016, (2007), 1-10.
- Tran N. H., Hu J., Li J., Ong S. L. **Suitability of artificial sweeteners as indicators of raw wastewater contamination in surface water and groundwater.** Water Research 48, (2014), 443-456.
- Tran N.H., Reinhard M., Gin K.Y-H. **Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review.** Water Research 133, (2018), 182-207.
- Tsui, M.M.P., Leung, H.W., Lam, P.K.S., Murphy, M.B. **Seasonal occurrence, removal efficiencies and preliminary risk assessment of multiple classes of organic UV filters in wastewater treatment plants.** Water Research 53, (2014), 58-67.



- Van Stempvoort D.R., Roy J.W., Grabuski J., Brown S.J., Bickerton G., Sverko E. **An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater.** Science of the Total Environment. 461, (2013), 348-359.
- Vistuba J.P., Dolzan M.D., Vitali L., Leal de Oliveira M.A., Micke G.A. **Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis.** Journal of Chromatography A 1396, (2015), 148–152.
- Vuorensola K., Sirén H., Kostianen R., Kotiaho T. **Analysis of catecholamines by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-nanospray mass spectrometry Use of aqueous and non-aqueous solutions compared with physical parameters.** Journal of Chromatography A 979, (2002), 179-189.
- Walker J.C., Zaugg S.E., Walker E.B. **Analysis of beverages by capillary electrophoresis.** Journal Chromatography A, 187, (1997), 481-485.
- Wang J.L., Xu L.J. **Advanced oxidation processes for wastewater treatment: formation of hydroxyl radical and application.** Critical Reviews in Environmental Science and Technology 42 (3), (2012), 251-325.
- Wang N., Su M., Liang S., Sun H. **Sensitive Residue Analysis of Quinolones and Sulfonamides in Aquatic Product by Capillary Zone Electrophoresis Using Large-Volume Sample Stacking with Polarity Switching Combined with Accelerated Solvent Extraction.** Food Analytical Methods 9, (2016), 1020-1028.
- Wasik A., McCourt J., Buchgraber M. **Simultaneous determination of nine intense**



- sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection-Development and single-laboratory validation.** Journal of Chromatography A 1157, (2007), 187-196.
- Weinert L.P. Redigolo H., De Oliveira J., Paezza L. **A simplified spectrophotometric method for routine analysis of saccharin in comercial noncaloric sweeteners.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, (2004), 7788-7792.
- Wilkinson J., Hooda P.S., Barker J., Barton S., Swinden J. **Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field.** Environmental Pollution 231, (2017), 954-970.
- Witte, W. **Medical consequences of antibiotic use in agriculture.** Science 279, (1998), 996-997.
- Xu X., Jia Z., Shu Y., Liu L. **Dynamic pH junction–sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acids in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection.** Journal of Chromatography B 980, (2015), 20-27.
- Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P.K., Moon, H.B., Jeong, Y., Kannan, P., Achyuthan, H., Munuswamy, N., Kannan, K. **Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India.** Ecotoxicology and Environmental Safety 122, (2015), 565-572.
- Yang, L., Yu, L.E., Ray, M.B. **Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ photocatalysis.** Water Research 42 (3), (2008), 3480-3488.
- Yang D., Chen B. **Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by**



- HPLC7ESI-MS**. Journal of Agriculture and Food Chemistry 57, (2009), 3022-3027.
- Yang L., Zhou S., Xiao Y., Tang Y., Xie T. **Sensitive simultaneous determination of three sulfanilamide artificial sweeteners by capillary electrophoresis with on-line preconcentration and contact less conductivity detection**. Food Chemistry 188, (2015), 446–451.
- Yang Y-Y., Zhao J-L., Liu Y-S., Liu W-R., Zhang Q-Q., Yao L., Hu L-X., Zhang J-N., Jiang Y-X., Ying G-G. **Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) in surface and ground waters and their applications as indication of wastewater contamination**. Science of the Total Environment 616–617, (2018), 816–823.
- Zacharewski T.R., Meek M.D., Clemons J.H., Wu Z.F., Fielden M.R., Matthews J.B. **Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters**. Toxicological Sciences 46, (1998), 282-293.
- Zareitalabad P., Siemens J., Hamer M., Amelung W. **Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewaters: A review on concentrations and distribution coefficients**. Chemosphere 91, (2013), 725-732.
- Zhu Y., Gou Y., Ye M., James F. **Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography**. Journal of Chromatography A 1085, (2005), 143-146.
- Zygler A., Wasik A., Namiésnik J. **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**. Trends in Analytical Chemistry 28, (2009), 1082–1102.



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

