

**DESARROLLO DE UN MÉTODO HS-SPME Y GC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE
SAFROL EN BEBIDAS TIPO COLA**

LIBIA FONSECA GARCÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO HS-SPME Y GC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE
SAFROL EN BEBIDAS TIPO COLA**

LIBIA FONSECA GARCÍA

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
TÍTULO DE QUÍMICA**

DIRECTORA: ELENA E. STASHENKO. QUÍMICA, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

“El conocimiento nos hace responsables”

Ernesto Che Guevara



A mi familia

... y a todos aquellos que aunque ignorados y despreciados, día a día luchan por hacer de este un mundo solidario, justo y digno

Libia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena E. Stashenko por la hermosa oportunidad de trabajar en el laboratorio de Cromatografía, por confiar el desarrollo de este trabajo de investigación y por enseñarme que con trabajo diario y perseverancia los sueños pueden hacerse realidad

Al Dr. Jairo René Martínez por sus valiosos aportes en el desarrollo de este trabajo

A la Dra. Aidé Perea Villamil y al Dr. Alirio Palma , quienes muy comedidamente aceptaron la calificación de la tesis

Al Laboratorio de Cromatografía adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, quien suministró el soporte financiero para la realización del proyecto

A todos los compañeros y amigos

A Jorge, Angela, Monica y Maria Catalina.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
CEFS	<i>Committee of Experts on Flavouring Substances</i> (Comité de Expertos en Sustancias Saborizantes)
CSD's	<i>Carbonated Soft Drinks</i> (Bebidas carbonatadas sin alcohol)
DEA	<i>Drug Enforcement Administration</i> (Administración de Control de Drogas)
DVB	Divinilbenceno
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de Protección Ambiental)
FAO/OMS	Organización para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de la Salud
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act</i> (Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (cromatografía de gases, cromatógrafo de gases, según el contexto)
GC/MS	<i>Gas Chromatography / Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
GC/MS-MID	<i>Gas Chromatography / Mass Spectrometry - Multiple Ion Detection</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el modo de detección del ión múltiple)
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas Prácticas de Laboratorio)
GSH	<i>Glutathione</i> (Glutación)
HOS	1'-Hidroxisafrol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución)

HRGC/FID	<i>High Resolution Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama)
HRGC/MSD	<i>High Resolution Gas Chromatography – Mass Selective Detector</i> (Cromatografía de gases de alta resolución con detector selectivo de masas)
HSDB	<i>Hazardous Substances Data Bank</i> (Banco de datos de Sustancias Peligrosas)
HS – SPME	<i>Headspace – Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cancer)
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Fármacos para Uso Humano)
IFRA	<i>International Fragrance Association</i> (Asociación Internacional de Fragancias)
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> (Comité de Expertos en Aditivos de Alimentos de la FAO/OMS)
K-D	<i>Kuderna –Danish</i> (Sistema de concentración)
LD ₅₀	<i>Median Lethal Dose</i> (Dosis letal media)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación)
MDA	3,4-Metilenodioxianfetamina
MDE	N-Etil-3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
PA	Poli(acrilato)
PAP	<i>3'-Phosphoadenosine-5'-phosphate</i> (3'-Fosfoadenosin-5'-fosfato)
PAPS	<i>3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate</i> (3'-Fosfoadenosin-5'-fosfosulfato)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)

PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano) / divinilbenceno
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
RCRA	<i>Resource Conservation and Recovery Act</i> (Ley de Conservación y Recuperación de Recursos)
SARA	<i>Superfund Amendments and Reauthorization Act</i> (Ley de Enmiendas y Reautoización del Fondo Extraordinario)
SBSE	<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i> (Extracción por sorbente sobre barra magnética)
SCF	<i>Scientific Committee for Food</i> (Comité Científico para Alimentos)
SDE	<i>Simultaneous Distillation-Extraction</i> (Destilación – extracción simultánea)
SIM	<i>Selective Ion Monitoring</i> (Monitoreo del ión seleccionado)
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TDS	<i>Thermodesorption system</i> (Sistema de termodesorción)

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura del safrol.	19
Figura 2. Ruta de activación metabólica del safrol, vía sulfonación.	21
Figura 3. Ruta de activación metabólica del safrol, vía quinólfica.	22
Figura 4. Procedimiento para SPME. A. Fase de extracción de la muestra y B. Desorción de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.	28
Figura 5. Dispositivo para SPME: detalle de la fibra expuesta.	30
Figura 6. Modos de extracción básicos: A. Muestreo directo o por inmersión y B. Modo <i>headspace</i> .	32
Figura 7. Diagrama general de la metodología empleada en el desarrollo y validación del método.	37
Figura 8. Perfiles cromatográficos: A. Blanco de la fibra; B. Blanco del vial con magneto, para agitación de la muestra y C. Blanco del vial sin magneto.	42
Figura 9. Presentación del diseño factorial completo a dos niveles 2 ³ .	43
Figura 10. Presentación del diseño compuesto central 2 ² + estrella.	45
Figura 11. Procedimiento de preparación de las soluciones de trabajo, empleadas en la curva de calibración por el método de adición de estándar.	48
Figura 12. Perfiles cromatográficos de: A. Bebida usada como blanco: <i>Crush Tropical</i> , volátiles obtenidos por HS-SPME y HRGC/FID y B. Patrón de safrol.	52
Figura 13. Eficiencia de las fases estacionarias PDMS- 100 µm, PDMS/DVB- 65 µm y PA-85 µm en la extracción de safrol de bebidas tipo Cola por HS-SPME.	58
Figura 14. Diagrama de Pareto para la respuesta del detector, área-cuentas.	61

Figura 15.	Superficie de respuesta para el área.	62
Figura 16.	Perfil cromatográfico de los volátiles de la Coca-Cola, obtenidos por HS-SPME (fibra de PDMS-100 μm , 48 $^{\circ}\text{C}$ y 30 min de extracción) y HRGC/FID.	63
Figura 17.	Detalle de la señal generada por la bebida usada como blanco.	68
Figura 18.	Espectro de masas del safrol, (EI, 70eV).	69
Figura 19.	Perfiles cromatográficos obtenidos por HRGC/FID de: A. Coca-Cola tradicional y B. Coca-Cola <i>light</i> .	70
Figura 20.	Perfiles cromatográficos obtenidos por HRGC/FID de: A. Pepsi tradicional y B. Pepsi <i>light</i> .	71

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. <i>Ranking</i> de consumo mundial de refrescos.	12
Tabla 2. Composición de algunos refrescos carbonatados.	16
Tabla 3. Limitaciones de los métodos reportados para el análisis de safrol.	27
Tabla 4. Tipos de recubrimientos para SPME y sus aplicaciones.	31
Tabla 5. Descripción de reactivos, materiales y equipos empleados.	35
Tabla 6. Niveles de las variables evaluadas.	43
Tabla 7. Diseño factorial completo 2^3 .	44
Tabla 8. Niveles de las variables optimizadas.	45
Tabla 9. Diseño compuesto central 2^2 + estrella.	46
Tabla 10. Cantidad de solución <i>stock</i> de safrol empleada en la preparación de las soluciones de trabajo.	49
Tabla 11. Extracción de safrol, empleando diferente tipo de fibra.	57
Tabla 12. Resultados obtenidos del diseño experimental de <i>screening</i> , factorial completo 2^3 .	59
Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta, área-cuentas.	59
Tabla 14. Resultados obtenidos del diseño compuesto central 2^2 + estrella, rotatorio.	60
Tabla 15. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo generado para la optimización de las condiciones de extracción.	62
Tabla 16. Condiciones más favorables para la extracción del safrol de bebidas tipo Cola, por HS-SPME.	63
Tabla 17. Evaluación de la repetibilidad de tiempo de retención del safrol, por HRGC/FID.	64
Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad del área (cuentas) del safrol, por HRGC/FID.	65
Tabla 19. Evaluación de la eficiencia del método.	66

Tabla 20.	Determinación del safrol en bebidas tipo cola.	72
Tabla 21.	Extracción exhaustiva de safrol por HS-SPME.	73
Tabla 22.	Figuras analíticas de mérito para los métodos reportados en la literatura y del método desarrollado, para el análisis del safrol en bebidas tipo Cola.	75

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO DE REFERENCIA	15
1.1 BEBIDAS CARBONATADAS SIN ALCOHOL	15
1.1.1 Definición de bebida carbonatada sin alcohol.	16
1.1.2 Composición de las bebidas carbonatadas sin alcohol.	16
1.1.3 Clasificación de las bebidas carbonatadas sin alcohol.	18
1.1.4 Bebidas tipo Cola.	18
1.2 SAFROL	19
1.2.1 Generalidades.	19
1.2.2 Toxicidad.	20
1.2.3 Evaluaciones realizadas al safrol.	24
1.2.4 Reglamentaciones actuales.	24
1.3 ANTECEDENTES : ANÁLISIS DE SAFROL EN BEBIDAS	25
1.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	28
1.4.1 Dispositivo para microextracción en fase sólida.	29
1.4.2 Parámetros de extracción.	30
1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL ANÁLISIS DE SAFROL	34
2. PARTE EXPERIMENTAL	35
2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	35
2.2 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	38
2.2.1 Análisis por HRGC/FID.	38
2.2.2 Análisis por HRGC/MSD.	39
2.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL SAFROL DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME	41
2.3.1 Selección del tipo de recubrimiento.	41
2.3.2 Evaluación de los parámetros de extracción	42

2.3.3	Determinación de las condiciones óptimas de extracción.	44
2.4	DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	47
2.4.1	Evaluación de la repetibilidad del método para tiempo de retención (t_R) y área.	49
2.4.2	Evaluación de la eficiencia del método.	50
2.4.3	Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.	50
2.4.4	Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para el safrol, por HRGC/FID.	51
2.4.5	Evaluación de la especificidad y la selectividad del método.	53
2.5	ANÁLISIS DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME Y HRGC/FID	53
2.5.1	Cuantificación del safrol en bebidas tipo Cola.	54
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
3.1	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL SAFROL DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME	57
3.1.1	Selección del tipo de recubrimiento.	57
3.1.2	Evaluación de los parámetros de extracción	58
3.1.3	Determinación de las condiciones óptimas de extracción.	60
3.2	DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	64
3.2.1	Evaluación de la repetibilidad del método para tiempo de retención (t_R) y área.	64
3.2.2	Evaluación de la eficiencia del método.	66
3.2.3	Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.	67
3.2.4	Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para el safrol, por HRGC/FID.	67
3.2.5	Evaluación de la especificidad y la selectividad del método.	68
3.3	ANÁLISIS DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME Y HRGC/FID	70
3.3.1	Cuantificación del safrol en bebidas tipo Cola.	71
3.4	COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS REPORTADOS EN LA LITERATURA CON EL MÉTODO DESARROLLADO POR HS-SPME, PARA LA DETERMINACIÓN DE SAFROL EN BEBIDAS TIPO COLA	74

4.	CONCLUSIONES	77
5.	RECOMENDACIONES	79
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXO 1	86
	ANEXO 2	87
	ANEXO 3	88

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UN MÉTODO HS-SPME Y GC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE SAFROL EN BEBIDAS TIPO COLA*

AUTOR: FONSECA GARCÍA, LIBIA**

PALABRAS CLAVES: Bebidas *Cola*, microextracción en fase sólida, diseño experimental

DESCRIPCIÓN

Se desarrolló y validó un método para la determinación de safrol en bebidas tipo *Cola*. El safrol es una sustancia catalogada como cancerígena en humanos, según la IARC. Los métodos tradicionales para este tipo de análisis presentan grandes limitantes que fueron superadas por el método desarrollado por microextracción en fase sólida en el modo *headspace*.

La metodología empleada comprendió cuatro etapas a saber: optimización de condiciones de extracción mediante un diseño experimental de *screening* factorial completo 2^2 y un diseño de superficie de respuesta; determinación de las figuras analíticas de mérito; cuantificación y extracción exhaustiva por el método de la adición de estándar, y, por último, la comparación de los métodos reportados en la literatura para el análisis de safrol en bebidas con el nuevo método.

Las condiciones de extracción encontradas fueron: fibra de PDMS-100 μm , temperatura de 48 °C y tiempo de exposición de la fibra de 30 min. Los resultados obtenidos en la cuantificación fueron: Coca-Cola tradicionales: 25.4 ppb y 35.3 ppb, Pepsi-Cola tradicional: 38.3 ppb, Coca-Cola *light*: 51.9 ppb y Pepsi-Cola *light*: 36.1 ppb. Extracción exhaustiva: 348.6 ng en la Coca-Cola analizada.

Es responsabilidad de las empresas que comercializan estas bebidas, garantizar la inocuidad de su producto o como en el caso presentado en esta investigación, donde a pesar de estar el safrol en un nivel permitido, este compuesto tiene un efecto acumulativo en el ADN; el consumidor debe ser advertido ante un peligro potencial para su salud.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Elena E. Stashenko.

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A HS-SPME AND GC-MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF SAFROLE IN COLA DRINKS*

AUTHOR: FONSECA GARCÍA, LIBIA **

KEY WORDS: cola drinks, solid phase microextraction, experimental design

DESCRIPTION

A method was developed and validated for the determination of safrole in cola drinks. Safrole is a substance classified as cancerogenic in humans, according to the IARC. The traditional methods for this analysis have restrictions that were overcome by the method developed by headspace solid-phase microextraction.

The methodology used comprised four stages: optimization of extraction conditions by means of a screening experimental design: full factorial 2^2 and a response surface design; determination of analytical figures of merit; quantification and exhaustive extraction for the method standard addition, and lastly, the comparison of methods reported in the literature for the safrole analysis in drinks with the new method.

The extraction conditions found were: 100 μm PDMS fiber, temperature of 48 °C and extraction time of 30 min. The results obtained in the quantification were: traditional Coca Cola: 25.4 ppb and 35.3 ppb; traditional Pepsi Cola: 38.3 ppb; light Coca Cola: 51.9 ppb; and light Pepsi Cola: 36.1 ppb. Exhaustive extraction: 348.6 ng in the analyzed Coca Cola.

It is a responsibility of the companies which commercialize these drinks, to guarantee the safety of their products or as in the case presented in this research, where despite of being safrole in permitted level, this compound has an accumulative effect in the DNA, so that consumers should be warned of a potential danger in health.

* Project degree

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Elena E. Stashenko.

INTRODUCCIÓN

Las bebidas carbonatadas sin alcohol (CSD's) comprenden uno de los grupos de alimentos más consumidos en la actualidad, muchas veces por sus propiedades estimulantes o simplemente por su delicioso sabor o porque quitan la sed, tal como lo revela el *ranking* de consumo de refrescos a nivel mundial, el cual se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Ranking* de consumo mundial de refrescos [1].

País	Consumo <i>per cápita</i> , litros/año
Estados Unidos	201
México	149
Reino Unido	92
Suecia	74
Brasil	66
República Checa	52
Colombia	38
Japón	21
China	6
India	2
Etiopia	1

De esta enorme gama de productos, sobresalen las bebidas tipo Cola, ya que según el reporte de la *Beverage Marketing Corporation* (BMC) del 2004, éstas dominan el 52 % del mercado mundial de CSD's [2], donde las marcas líderes son *Coca-Cola* y *Pepsi-Cola*.

De estas últimas, el imperio Coca-Cola es insuperable, siendo el consumo *per cápita* en litros/año de 103.3 en los Estados Unidos, de 115.4 en México y de 79.1 en Chile [3], según el reporte de Servicio Nacional del Consumidor de Chile, publicado el 12 de mayo del año en curso.

El consumo masivo de estas bebidas las convierte en un punto delicado a tratar ya que compromete la salud de muchas personas en el mundo. El desarrollo de tecnologías, que permitan el control de salubridad y toxicidad es, por tanto, indispensable, lo cual implica un método de análisis sensible, reproducible y, ante todo, que permita una cuantificación fiable, dadas las implicaciones legales del análisis.

Este trabajo se basó en el establecimiento de un método para el análisis de safrol, una sustancia genotóxica y hepatocancerígena en animales de prueba, anticipadamente catalogada como cancerígena en humanos, según la Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC) [4], dado su efecto de tipo acumulativo por formación de aductos safrol-ADN [5-7], cuyos efectos nocivos para la salud humana son bien conocidos. Tal es el caso de un hombre taiwanés que tan sólo con mascar una goma saborizada con un aceite esencial rico en esta sustancia, desarrolló un carcinoma hepatocelular [8-10].

El safrol, encontrado en numerosas especias, a pesar de ser restringido por el SCF, el CEFS, por la EPA y por la FDA, es ampliamente utilizado en perfumería y como aditivo en alimentos, en especial, en bebidas carbonatadas no alcohólicas tipo Cola [11] como la Coca-Cola y la Pepsi-Cola.

El límite de safrol permitido en alimentos y bebidas es de 1 mg/kg [11]; sin embargo, dado el efecto acumulativo del safrol en el ADN, es importante tener en cuenta la baja concentración o el nivel de trazas en que se encuentra en las bebidas (del orden de partes por billón, ppb), ya que es necesario contar con un método que sea sensible,

reproducibile, eficiente, rápido y económico y, ante todo, que permita una cuantificación fiable del safrol a este nivel de concentración.

Los métodos tradicionales para este tipo de análisis, dentro de los cuales se cuentan: hidrodestilación, destilación-extracción simultánea y el método 969.13 de la AOAC (Véase en la **Tabla 3** las limitaciones de los métodos reportados para el análisis del safrol en bebidas), en general, requieren mucha muestra, uso de grandes cantidades de solventes, que frecuentemente son tóxicos y/o dañinos para el medio ambiente, montajes dispendiosos, una inversión enorme de tiempo, además, en muchas ocasiones no tienen en cuenta los efectos de matriz y no alcanzan la sensibilidad requerida.

En el presente trabajo, realizado en el Laboratorio de Cromatografía adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, se desarrolló y validó un método para la determinación de safrol en bebidas tipo Cola por cromatografía de gases de alta resolución con detectores de ionización en llama y selectivo de masas, empleando la técnica de microextracción en fase sólida en el modo *headspace*. La metodología empleada en el desarrollo y en la validación del método comprendió cuatro etapas a saber: optimización de condiciones de extracción mediante un diseño experimental de *screening* factorial completo 2^3 y un diseño de superficie de respuesta; determinación de las figuras analíticas de mérito, tales como: precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación, linealidad y sensibilidad, y especificidad y selectividad; cuantificación y extracción exhaustiva por el método de la adición de estándar, y, por último, la comparación de los métodos reportados en la literatura para el análisis de safrol en bebidas con el nuevo método desarrollado.

Los resultados preliminares de esta investigación fueron presentados como ponencia titulada “Determinación por HRGC/MSD de safrol en bebidas carbonatadas no alcohólicas tipo Cola, empleando microextracción en fase sólida en el modo *headspace*”, en el Congreso Colombiano de Química, realizado durante los días 15 al 17 de octubre de 2004 en la ciudad de Cartagena D.T.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 BEBIDAS CARBONATADAS SIN ALCOHOL

Existen varias clases de bebidas que no se toman por su valor nutritivo, sino por su poder de quitar la sed o por sus efectos estimulantes. De este gran grupo, las bebidas carbonatadas sin alcohol constituyen una división muy importante. Éstas, de las que los refrescos son el principal ejemplo, datan de la época greco-romana en que las aguas minerales eranpreciadas por sus propiedades medicinales y refrescantes. Sin embargo, no fue sino hasta 1767 que el británico Joseph Priestley descubrió la manera de carbonatar el agua por medios artificiales, dando inicio a lo que sería la industria de estas bebidas [12,13].

En uno de los primeros intentos, se obtenía el dióxido de carbono mediante la acidificación del bicarbonato de sodio, el uso de tales sales originó el nombre “soda,” nombre que aún se emplea aunque el dióxido de carbono ya no se genera usando este procedimiento [13].

En 1807 en New Haven, Benjamín Silliman inauguró la primera embotelladora. Posteriormente, en 1809 se concedió la primera patente norteamericana a Joseph Hawkis para preparar agua mineral artificial. En 1850 en los Estados Unidos se reportaron 64 plantas embotelladoras, número, que en 1860 ascendió a 123 y que desde entonces no ha parado de crecer [12].

Los sabores a las bebidas fueron introducidos en 1865, siendo los más populares de piña, naranja, manzana, pera, melón, limón, cereza, uva y durazno. La variedad de dichas bebidas y su gran acogida en todo el mundo ha logrado desplazar, desde los

años 70's en niveles de producción a alimentos indispensables para el consumo diario, tales como la leche. Hay quienes afirman que se ha logrado cambiar la popularidad del vino en Francia, del té en Inglaterra y del café en el Brasil [12].

1.1.1 Definición de bebida carbonatada sin alcohol. De acuerdo con el Departamento de Salud de los Estados Unidos y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), una bebida carbonatada sin alcohol o gaseosa se define como “una clase de bebida elaborada por absorción de dióxido de carbono en el agua potable. La cantidad de dióxido de carbono no debe ser menor que la cantidad absorbida por la bebida a 1 atm de presión y a una temperatura de 60° F (15.5 °C)” [12].

1.1.2 Composición de bebidas carbonatadas sin alcohol. Azúcares, saborizantes, colorantes, ácidos, agua y dióxido de carbono son los principales ingredientes de los refrescos carbonatados [13,14]. En la **Tabla 2** se resume la composición de algunos refrescos carbonatados.

Tabla 2. Composición de algunos refrescos carbonatados [13].

Sabor	Azúcar (°Brix)	Volumen de gas de carbonatación ¹	Ácido, %	pH
Cola	10.5	3.4	0.09	2.6
Limón y lima	12.6	2.4	0.10	3.0
Naranja	13.4	2.3	0.19	3.4
Cereza	12.0	2.4	0.09	3.7
Uva	13.2	2.2	0.10	3.0

¹ Relación de volumen de gas (bajo condiciones estándar: 1atm y 0 °C) por cada volumen de líquido

El azúcar empleado es principalmente sacarosa, a éste se le añaden saborizantes, colorantes y ácidos. El producto final contiene del 8 al 14% de azúcar, el cual contribuye con su dulzura, su contenido en calorías y le da cuerpo y textura a la bebida [12,13].

Los saborizantes pueden ser sintéticos, extractos de sabores naturales o concentrados de jugos de fruta [14]; deben ser estables ante las condiciones ácidas de la bebida y bajo exposición a la luz durante un año como mínimo. Un sabor artificial de fruta, que contiene compuestos saborizantes sintéticos y extractos de sabores naturales, puede contener más de dos docenas de componentes saborizantes diferentes. Los sabores de Cola suelen ser igualmente complejos o más; sus composiciones son secretos celosamente guardados, cuyas formulaciones contienen ingredientes que dificultan su análisis químico y su duplicación [12,13]. Generalmente, contienen cantidades considerables de cafeína (40-50 mg por cada 360 mL de la bebida), que es un poderoso estimulante del sistema nervioso central [15].

Los colorantes son de tipo sintético como las anilinas y no sintético como el color obtenido del azúcar quemado empleado en las bebidas sabor Cola [12,13].

El dióxido de carbono contribuye a la acidez, pero se le suplementa con un contenido adicional de ácido. Entre los más utilizados para tal fin figuran los ácidos fosfórico, cítrico, tartárico y el ácido málico, siendo el primero el que se emplea en Cola y cerveza de raíz. La acción preservante del ácido se complementa con un contenido de 0.03 – 0.05% de benzoato de sodio en el producto final, el cual bajo estas condiciones se convierte al ácido benzoico, que es un conservante aún más efectivo [12,13].

El agua representa el 92% de la bebida, por lo tanto, es necesario hacerle un tratamiento adicional a fin de satisfacer los estándares de calidad en alcalinidad, sólidos totales, turbidez, color, olor, sabor, materia orgánica, hierro, manganeso y cloro [12,13].

La efervescencia, el sabor especial y la identidad de esta clase de bebida es el resultado de su contenido en dióxido de carbono, el cual varía según el sabor y la marca en una proporción de 3 – 4.5 volúmenes de gas por cada volumen de líquido [13,14].

1.1.3 Clasificación de las bebidas carbonatadas sin alcohol. Las bebidas carbonatadas no alcohólicas conocidas comúnmente como gaseosas se clasifican como: 1. Tipo Cola; 2. Tipo Jengibre (*ginger*); 3. Jugos de fruta coloreados y saboreados naturalmente y 4. Los saboreados y coloreados sintéticamente [12].

1.1.4 Bebidas tipo Cola. Las bebidas tipo Cola deben su designación de Cola a un fruto de *Cola vera* y *Cola acuminata*, llamado "Nuez de Cola", el cual es uno de los principales componentes empleados en la elaboración de dichas bebidas. Las bebidas Cola más famosas por su sabor y por su consumo masivo en todo el mundo son la *Coca-Cola* y la *Pepsi-Cola* [2].

El complejo sabor de Cola (fórmula MF 241) está compuesto principalmente de:

- ✓ Esencia de nuez de Cola (fórmula MF 237), contiene 2% de cafeína y 0.02% de teobromina;
- ✓ Sabor Cola base (fórmula MF238), contiene aceites esenciales de canela, nuez moscada, naranja y limón;
- ✓ Agua;
- ✓ Glicerina;
- ✓ Jugo de lima;
- ✓ Caramelo.

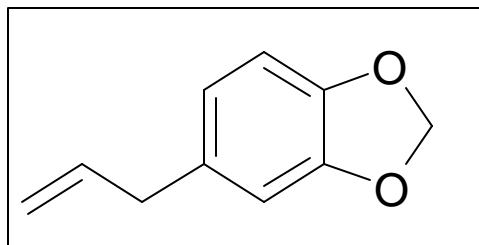
Adicionalmente, el llamado concentrado de sabor Cola contiene cafeína y ácido fosfórico al 85 % [14].

De los aceites esenciales, que dan sabor a esta bebida, los de canela [16,17] y nuez moscada [14,16,17] contienen safrol, un terpenoide presumiblemente cancerígeno, cuyo uso en fragancias está restringido por la Asociación Internacional de Fragancias (IFRA) a un nivel máximo de 0.01% en el producto final [16]; cuando es usado en alimentos, tanto por la Comunidad Europea como en el Reino Unido, tan sólo se permite una concentración de 0.001 g/kg [16].

1.2 SAFROL

1.2.1 Generalidades. El safrol es un líquido ligeramente amarillo a temperatura ambiente con un característico olor a sasafrás (es el componente mayoritario de este aceite). Es insoluble en agua y glicerol, ligeramente soluble en propilenglicol y muy soluble en etanol, éter, acetona y cloroformo [11,18]. La estructura del safrol se muestra en la **Figura 1**.

Figura 1. Estructura del safrol.



El safrol es un compuesto volátil, constituyente de numerosas especias como la nuez moscada (0.6-3.3%), alcanfor marrón (80%), anís estrella (1%), pimienta negra y en más del 85% en el sasafrás [11,16-18]. El aceite esencial de sasafrás, cuyo principal componente es el safrol, fue empleado en la elaboración de la cerveza de raíz y su uso en esta bebida fue prohibido en los Estados Unidos en 1960 [18]. Actualmente, se emplea en drogas, perfumes, alimentos, bebidas tipo Cola [11] y en la síntesis de heliotropina, butóxido de piperonilo y drogas de diseño como 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), N-etil-3,4-metilenodioxianfetamina (MDE) y 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, conocida comúnmente como “Éxtasis”); por lo tanto, es una sustancia controlada por la Administración de Control de Drogas (DEA) del Departamento de Justicia de los Estados Unidos [19]. Se hace referencia al safrol en la Lista I (Código 8323) de la DEA de sustancias precursoras de drogas ilícitas.

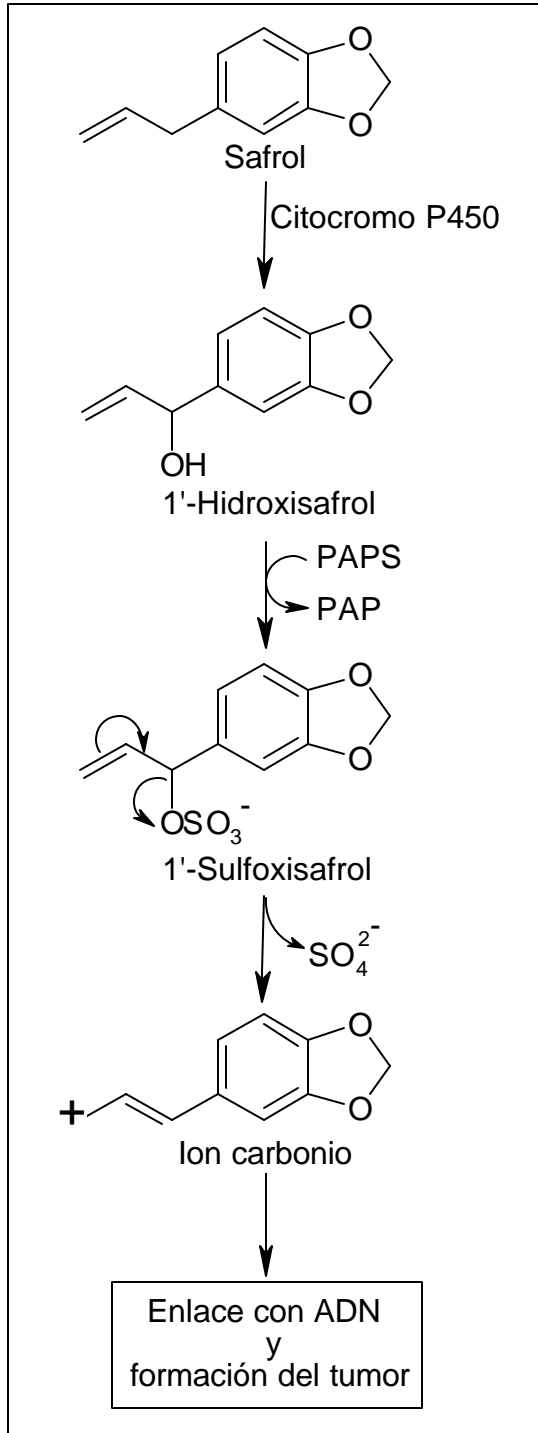
Comercialmente el safrol se produce por destilación de aceites ricos en esta sustancia. La producción de safrol en los Estados Unidos fue de 258.000 lb y 278.000 lb en 1969 y 1970, respectivamente, pero sólo de 12000 lb en 1977, según la Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1976) y el Banco de Datos de Sustancias Peligrosas (HSDB, 2001). En 1980 se importaron de Brasil cerca de 36000 lb de safrol, según lo reportó el HSDB. No se encontraron datos de importaciones ni de exportaciones actuales [18].

1.2.2 Toxicidad. El safrol es anticipadamente catalogado como cancerígeno en humanos según la IARC [4], basado en la suficiente evidencia de carcinogenicidad y genotoxicidad [20] en animales de prueba [11,16-18]. Cuando se administra en dieta se incrementa la incidencia de carcinomas hepatocelulares en ratones de ambos sexos, cuando se administra a ratones pequeños vía subcutánea, el safrol induce adenomas y adenocarcinomas de pulmón en ratones de ambos sexos y hepatomas en ratones [11,18].

☞ **Absorción, distribución, metabolismo y excreción.** El safrol está clasificado como procarcinogénico, ya que no actúa en el punto de aplicación sino en tejidos específicos como el hígado; requiere de una activación metabólica para actuar sobre el ADN y, aunque en dosis mínimas no tiene un efecto detectable, actúa de manera acumulativa por formación de aductos safrol-ADN [5]. La bioactivación por interacción con el citocromo P450 se da por cuatro rutas, a saber:

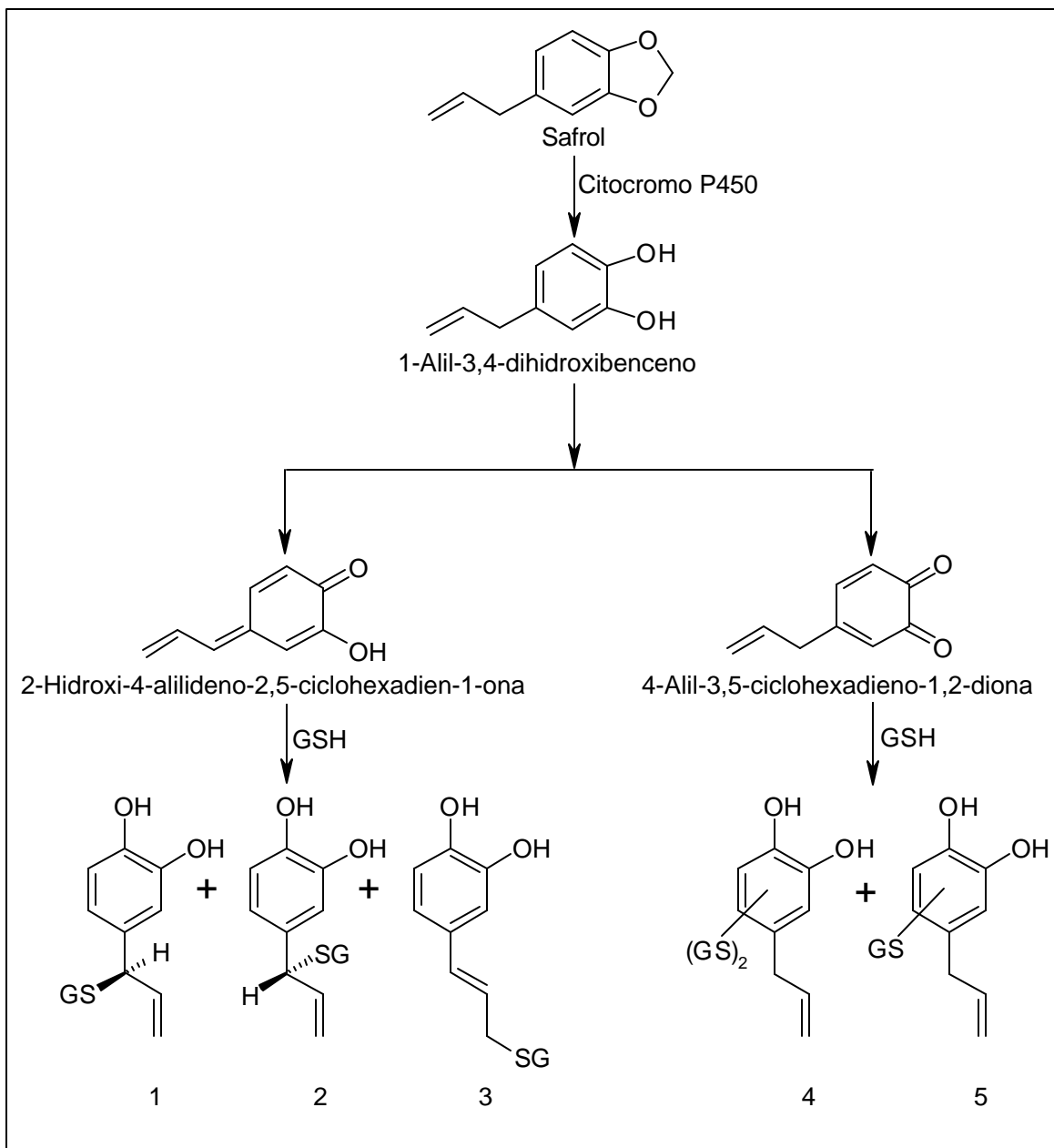
1. Hidroxilación del carbono bencílico del safrol, catalizada por las enzimas CYP2C9 y CYP2E1 [6,7,21], (**Figura 2**), dando 1'-hidroxisafrol (HOS); sulfonación catalizada por una sulfotransferasa, usando como cofactor para la reacción el 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato (PAPS), obteniendo 1'-sulfoxisafrol, metabolito iniciador del tumor; por último, alquilación del ADN por desplazamiento del grupo sulfato [22,23]

Figura 2. Ruta de activación metabólica del safrol, vía sulfonación [23].



2. Inicialmente, la O-desalquilación (**Figura 3**) del anillo metilendioxi, formando el 1-alil-3,4-dihidroxibenceno; oxidación a 4-alil-3,5-ciclohexadieno-1,2-diona, e isomerización a 2-hidroxi-4-alilideno-2,5-ciclohexadien-1-ona, seguida de la conjugación con glutatión (GSH), para la formación de los aductos correspondientes 1-5 [24]

Figura 3. Ruta de activación metabólica del safrol, por formación de quinonas [24].



3. Epoxidación de la cadena alílica o, en menor proporción, del anillo aromático y formación de aductos covalentes con guanina *in vitro* [17]
4. Oxidación gama de la cadena alílica, primero a ácido piperonílico, seguida de conjugación con glicina, dando piperonilglicina [11].

El safrol es absorbido rápidamente por el tracto gastrointestinal por difusión pasiva en animales de experimento (rata, ratón y conejillo de indias) [11], cuyas principales rutas metabólicas son 1 y 2, siendo el HOS y el 1-alil-3,4-dihidroxibenceno los principales metabolitos. Cuando se suministran pequeñas dosis de safrol (0.165 ó 1.655 mg para humanos y 0.63 mg/kg para ratas), marcado con radioisótopo ^{14}C en la posición 1' de la cadena alílica, éste se absorbe rápidamente y se excreta casi totalmente como 1-alil-3,4-dihidroxibenceno en forma conjugada, en la orina en ambas especies en tan sólo 24 horas. Cuando se incrementa la dosis en ratas de 0.63 a 750 mg/kg, sólo el 25% del safrol se excreta en 24 horas [11,25].

El HOS se detectó en forma conjugada en la orina de las ratas, pero su presencia no se registró en la orina de humanos, esto no excluye la posible formación de pequeñas cantidades de HOS con posterior enlace a macromoléculas como el ADN en el hígado [25]. Un estudio paralelo identificó aductos safrol-ADN cuando se suministraron a ratones bebidas tipo Cola, en lugar de agua [26].

☞ **Toxicidad aguda.** La dosis letal media (LD_{50}) oral reportada para ratas, ratones y conejos es de 1950, 2350 [11] y 1000 mg/kg de peso del animal [16], respectivamente. Hasta el momento se ha reportado oficialmente sólo un caso de carcinoma hepatocelular en humanos; es el caso de un hombre taiwanés que mascó durante 32 años una goma saborizada con aceite esencial de inflorescencias de *Piper betle*, en donde se encuentra el safrol en altas concentraciones (15 mg/g en peso de material vegetal fresco). En la biopsia realizada al hígado del paciente se encontraron aductos safrol-ADN [9,10].

1.2.3 Evaluaciones realizadas al safrol. El Comité Científico para Alimentos (SCF) en su opinión del 21 de septiembre de 1979 limita el uso de safrol en alimentos y bebidas a 1 mg/kg con las siguientes excepciones: 5 mg/kg en bebidas alcohólicas con más del 25% de alcohol, 15 mg/kg en alimentos que contengan nuez moscada y 2 mg/kg en bebidas con menos de 25% de alcohol. Una evaluación posterior realizada por la IARC en 1976 y 1987 clasificó el safrol en el grupo 2B, el cual comprende agentes posiblemente carcinogénicos en humanos, dada la limitada evidencia de carcinogenicidad en humanos y menos que suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales de prueba [4]. Sin embargo, en 1981 el Comité de Expertos en Aditivos de Alimentos de la FAO/OMS (JECFA) declaró al safrol como cancerígeno [11].

En 1997 el Comité de Expertos en Sustancias Saborizantes (CEFS) del Consejo Europeo evaluó al safrol, así como sigue: “el safrol es un hepato-cancerígeno bajo en animales de experimento y es un genotóxico y cancerígeno transplacental. Se debe reducir su consumo en alimentos y bebidas tanto como sea posible”. CEFS propuso un límite de 0.5 mg/kg para alimentos y bebidas alcohólicas y 0.05 mg/kg para bebidas no alcohólicas [11].

1.2.4 Reglamentaciones actuales. En el Anexo II de la Directiva 88/388/EEC sobre saborizantes [11], se establecen los siguientes niveles máximos para safrol en comestibles y bebidas para los cuales sustancias con propiedades saborizantes han sido añadidas, a saber: 1 mg/kg, en general, con la excepción de 5 mg/kg para bebidas alcohólicas con más del 25% de alcohol y para alimentos que contienen nuez moscada; el safrol no debe ser añadido como tal a los comestibles [11]. Desde 1977 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha propuesto la cancelación del uso de safrol en pesticidas a través de la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA). La EPA regula el safrol a través de la Ley de Conservación y Recuperación de Recursos (RCRA) y la Ley de Enmiendas y Reautoización del Fondo Extraordinario (SARA) [18]. La FDA no aprueba el uso del aceite de sasafrás pero sí del de nuez moscada en alimentos [11,18].

1.3 ANTECEDENTES: ANÁLISIS DE SAFROL EN BEBIDAS

Desde que fueron conocidas públicamente la genotoxicidad y la carcinogenicidad del safrol, se han realizado enormes intentos con miras a su determinación en varias clases de alimentos. A continuación se hace referencia a algunos trabajos:

En 2001, en el Departamento de Saneamiento de Alimentos del Instituto Tecnológico de Ta-Jen, Taiwan, Youk-Meng Choong y Hsiu-Jung Lin [27], desarrollaron un método cromatográfico para la determinación cuantitativa de safrol e isosafrol en gaseosas, en el cual la muestra se inyectó directamente al cromatógrafo de gases sin pre-tratamiento y la determinación cuantitativa se llevó a cabo enriqueciendo las muestras por medio de la adición de un patrón. Se alcanzaron límites de detección de 0.25 µg/mL, porcentajes de recuperación variaron en el rango de 105 a 108% y coeficientes de variación fueron más bajos (5.8%) en comparación con los del Método 969.13 de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) (9.7%) para la determinación de safrol en bebidas no alcohólicas, el cual implica destilación con arrastre de vapor, extracción con cloroformo y concentración por *Kuderna-Danish* (K-D) [28].

En 2002, Mónica Bonini y colaboradores [29] en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Agricultura de la Universidad de Milán, Italia, determinaron safrol en gaseosas por GC/MS-MID (*Multiple Ion Detection*). En este método, 500 mL de muestra fueron sometidos a la hidrodestilación por 2 horas. Según lo reportado, se obtuvieron recuperaciones del 80-93% con buena reproducibilidad (RSD: 2.7-5.1%) y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 10.0 y 30.0 µg/L, respectivamente, para un rango de concentración de 10.0 a 100.0 mg/L.

En 2003, un procedimiento para la extracción y determinación de estragol, safrol y 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-benceno en seis clases de alimentos (incluidas las bebidas tipo

Cola) fue desarrollado en Italia por Siano y colaboradores [30]. Los compuestos fueron aislados por destilación – extracción simultánea (SDE) con diclorometano, como solvente, y analizados por GC/MS. Para el safrol se obtuvieron porcentajes de recuperación en el rango de 94-105%, con límite de detección de 5 ng/mL y rango dinámico lineal comprendido entre 0.5 y 25 ppm. En ese mismo año, en el Instituto *Gerstel de Mülheim an der Ruhr*, Alemania, Adreas Hoffmann, Arnd Heiden y Edward Pfannkoch [31] determinaron safrol en bebidas Cola por una nueva técnica de extracción que utiliza una barra magnética recubierta por una fase estacionaria (*stir bar sorptive extraction* -SBSE). En este trabajo se usó un recubrimiento de poli(dimetilsiloxano); la barra se agitó durante 1 hora y después fue colocada en un sistema de termodesorción (TDS); el análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Un trabajo reciente, liderado por Helen Brown [32], dirigido a la determinación de safrol en alimentos, propone el uso de safrol-d₅ como estándar interno para su cuantificación. Esta propuesta fue hecha ya que se obtuvieron excelentes resultados (RSD 0.7%) en la cuantificación de un análogo del safrol, la cumarina, empleando cumarina-d₄ como estándar interno.

A continuación, en la **Tabla 3**, se listan las limitaciones de los métodos reportados para el análisis de safrol en bebidas no alcohólicas.

Tabla 3. Limitaciones de los métodos reportados para el análisis de safrol.

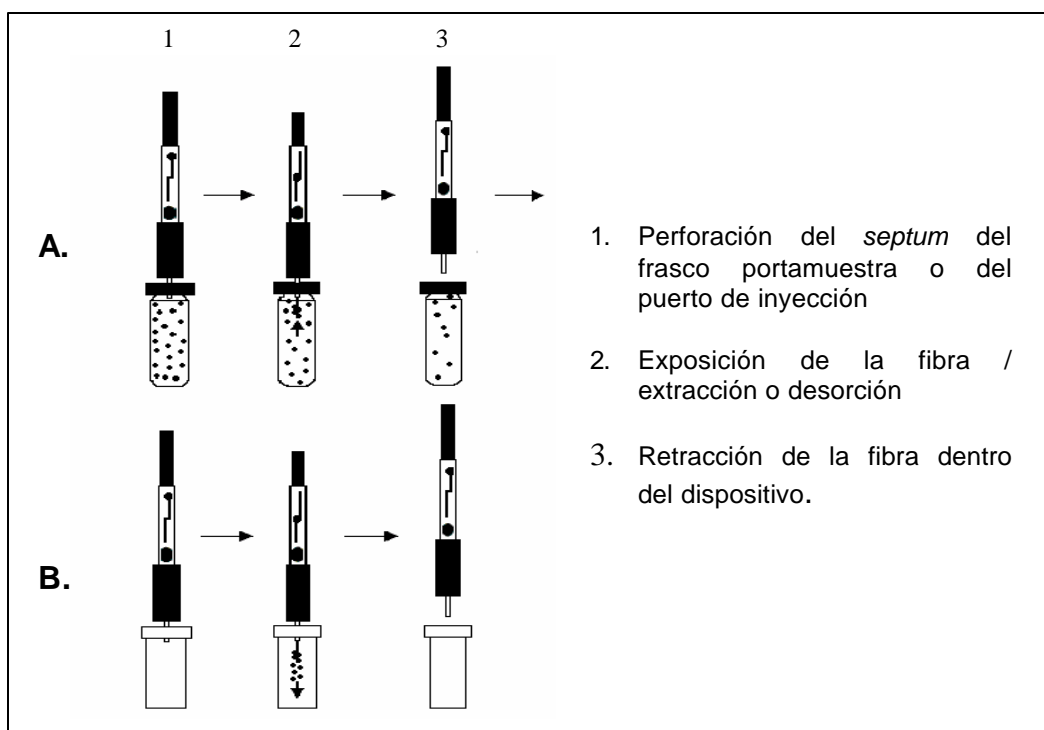
Técnica	Limitaciones
Método directo [27]	<ul style="list-style-type: none">✓ No tiene en cuenta las interferencias presentes en la matriz de la muestra;✓ El método no incluye concentración de los analitos, lo cual es indispensable para su cuantificación, cuando se encuentran a el nivel de trazas.
Destilación con arrastre de vapor (Método 969.13, AOAC) [28]	<ul style="list-style-type: none">✓ Requiere el uso de grandes cantidades de solvente como el cloroformo, el cual contamina el ambiente, es tóxico y aumenta el costo del análisis;✓ Requiere el uso de montajes complicados;✓ Requiere de un sistema de concentración tipo K-D;✓ El pretratamiento de la muestra requiere una inversión grande de tiempo.
Hidrodestilación [29]	<ul style="list-style-type: none">✓ Requiere volúmenes de muestra grandes (500 mL);✓ Tiempo de extracción prolongado (2 h);✓ Pérdida de analitos volátiles.
SDE [30]	<ul style="list-style-type: none">✓ Requiere el uso de solvente, lo que aumenta el costo de análisis;✓ Tiempo de extracción prolongado.
SBSE [31]	<ul style="list-style-type: none">✓ Requiere una unidad de desorción térmica especial, costosa;✓ Tiempo de extracción prolongado (1 h).
SPME [32]	<ul style="list-style-type: none">✓ Implica el uso de un estándar deuterado que puede no ser disponible y que incrementa el costo del análisis.

La técnica empleada para la realización de este proyecto fue microextracción en fase sólida, la cual presenta múltiples ventajas que serán descritas a continuación.

1.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Desde ya hace más de una década [33] una nueva técnica ha venido siendo desarrollada por Janusz Pawliszyn y su grupo de colaboradores en la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá [34,35]. El método, conocido actualmente como microextracción en fase sólida (SPME) fue introducido al mercado en 1993 por la firma Supelco [36]; se fundamenta en la repartición de los analitos entre una fase extractiva soportada sobre una fibra de sílice fundida y la matriz de la muestra. Una segunda etapa de este proceso consiste en la termodesorción de los analitos en el puerto de inyección o la redisolución de éstos en un solvente orgánico, según sea el instrumento analítico empleado, cromatógrafo de gases o cromatógrafo líquido, respectivamente (**Figura 4**) [32-38]. SPME no requiere solvente y combina en un solo paso la extracción y la concentración de los analitos [33].

Figura 4. Procedimiento para SPME. **A.** Fase de extracción de la muestra y **B.** Desorción de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

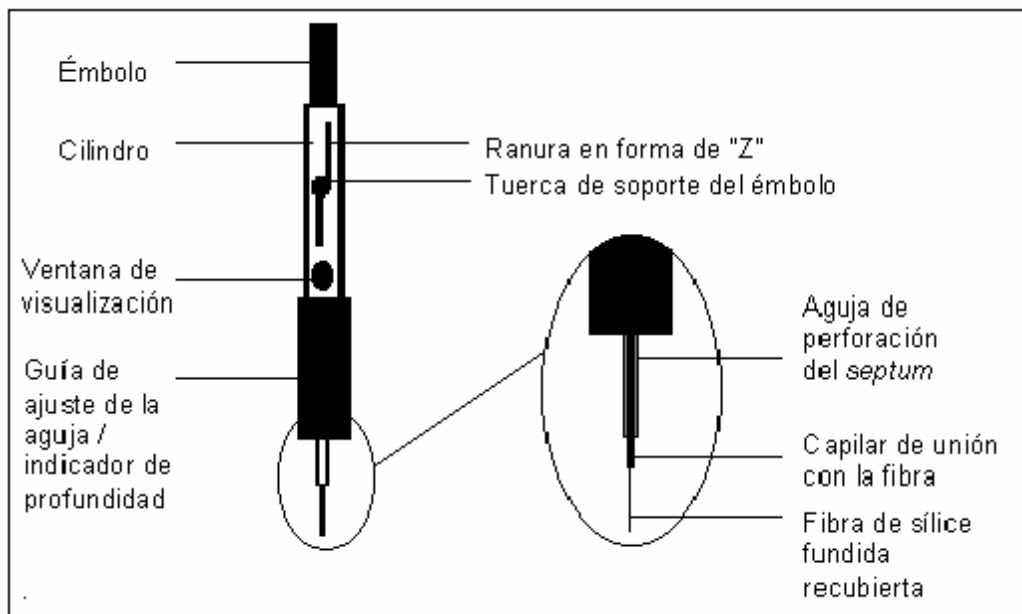


La fase extractiva, o sea fase estacionaria o recubrimiento, puede ser un polímero líquido altamente viscoso y de elevado peso molecular, un sorbente sólido de alta porosidad para incrementar el área superficial dispuesta para la adsorción, o bien una combinación de ambos. Los analitos son removidos de la muestra por absorción (en el caso de un recubrimiento líquido) o por adsorción (cuando es sólido) [38,39]. Sin embargo, en ambos casos el proceso de extracción viene dado por la adsorción de los analitos en la interfase matriz – fase extractora, seguido de la difusión de los analitos a la fase de extracción. Si el coeficiente de difusión del analito en la fase de extracción es alto, éste se reparte completamente entre las dos fases y la absorción se lleva a cabo. Pero si el coeficiente de difusión es bajo, los analitos se retienen en la interfase y se da la adsorción [40].

1.4.1 Dispositivo para microextracción en fase sólida. La **Figura 5** ilustra el dispositivo comercial para SPME. La fibra de sílice fundida de 1 cm de longitud junto con su recubrimiento se encuentran unidas a una pieza tubular de acero inoxidable, la cual se encuentra ensamblada a un receptáculo (*holder*), similar a una microjeringa modificada.

Éste se encuentra equipado con una regla ajustable y con un émbolo, cuyo movimiento está limitado por un tornillo que se desplaza a través de una ranura en forma de “Z” [35,38].

Figura 5. Dispositivo para SPME, detalle de la fibra expuesta.



1.4.2 Parámetros de extracción. Parámetros como la polaridad y el espesor del recubrimiento de la fibra, el modo de muestreo (directo o *headspace*), la temperatura, el contenido de sal, el pH, la forma de agitación y el tiempo de exposición de la fibra son puntos críticos a la hora de realizar un muestreo por SPME. De estas variables dependen la obtención de resultados consistentes, la selectividad y la detección fiable de los compuestos de interés, especialmente, cuando éstos se encuentran en bajas concentraciones [35,38].

☞ **Polaridad de la fibra.** La elección de la fase estacionaria para llevar a cabo el proceso de extracción es función de la polaridad del analito. En este sentido, analitos no polares son más eficientemente extraídos por recubrimientos no polares y, vice versa, analitos polares lo son por fases estacionarias polares [35,36,38]. En la **Tabla 4** se hace referencia a los tipos de recubrimientos y sus aplicaciones.

Tabla 4. Tipos de recubrimientos para SPME y sus aplicaciones [36]

Fase estacionaria/espesor	Analitos	Análisis
Poli(dimetilsiloxano) (PDMS)	Volátiles y semivolátiles apolares a polaridad media	GC, HPLC
PDMS/divinilbenceno (DVB)	Volátiles polares, semivolátiles	GC, HPLC
Poli(acrilato) (PA)	Semivolátiles polares	GC, HPLC
Carboxen TM /PDMS	Gases y analitos de bajo peso molecular	GC
Carbowax [®] /DVB	Analitos polares	GC
Carbowax/Resina Templada	Surfactantes	HPLC

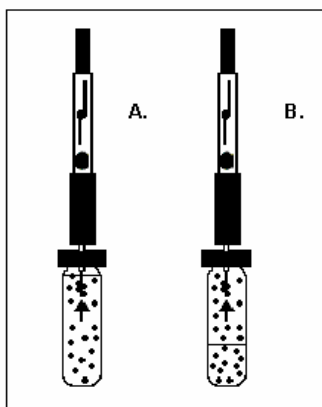
☞ **Espesor de la fase estacionaria.** La selección del espesor de la fase estacionaria se realiza de acuerdo con la volatilidad del analito. Para compuestos volátiles se usan recubrimientos gruesos, con el fin de aumentar su retención en la fase estacionaria y transferirlos sin pérdidas al puerto de inyección [35,38]. En el caso de compuestos semivolátiles es necesario usar una película delgada para asegurar una difusión rápida de los analitos durante la termodesorción [35,41]; no usarla, implicaría mayor tiempo y temperatura de desorción.

☞ **Modos de extracción.** El muestreo por SPME puede ser realizado básicamente por tres modos: extracción directa o por inmersión, extracción indirecta o *headspace* y extracción directa con protección de membrana.

En el primer modo (**Figura 6A**), la fibra se introduce dentro de la muestra y los analitos se transportan directamente de la matriz de la muestra a la fase de extracción. En el modo *headspace* (**Figura 6B**), los analitos se extraen de la fase gaseosa, seguida por

la extracción “indirecta” desde la matriz, su fase vapor. Esta modalidad permite proteger la fibra de los efectos adversos causados por sustancias no volátiles de alto peso molecular presentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, ácidos húmicos y proteínas). Además, se logran tiempos de equilibrio más cortos que por extracción directa por tres razones, a saber: **1.** Antes de realizar el muestreo ya existen los analitos en el *headspace*; **2.** Típicamente, hay una interfase grande entre la matriz de la muestra y el *headspace* y, **3.** Los coeficientes de difusión en la fase gaseosa son cuatro veces más altos que en la fase líquida. Por último, en un tercer modo de extracción, con protección, la fibra se separa de la muestra con una membrana selectiva que bloquea el paso de las interferencias a la fibra [36,38,40].

Figura 6. Modos de extracción básicos: **A.** Muestreo directo o por inmersión y **B.** Modo *headspace*.



La selección del modo de operación está dado por el tipo de matriz, la volatilidad del analito (es función de la presión de vapor) y la afinidad del analito o de los componentes de la matriz por la fibra. Los analitos con alta presión de vapor pueden ser extraídos en el modo directo y en el modo *headspace*. Los compuestos semivolátiles o de muy baja presión de vapor deben extraerse por inmersión [35].

☞ **Temperatura.** La temperatura afecta la sensibilidad y la velocidad de la extracción [40]. El uso de calentamiento durante el muestreo en el modo *headspace* ayuda a remover más analito de la muestra, incrementando así la sensibilidad del método. Sin embargo, ésta puede verse disminuida si la temperatura es alta ya que la constante de

distribución se disminuye y, por ende, la cantidad de analitos extraídos por la fibra. Ésto es particularmente cierto cuando se usa un absorbente como PDMS. Por lo general, las extracciones por inmersión no requieren calentamiento [35].

☞ **Adición de sal y ajuste de pH.** El ajuste del pH y la adición de sal aumentan la eficiencia de la extracción por cambios en la solubilidad de los analitos en la muestra. La adición de sal incrementa la fuerza iónica de la muestra, lo cual reduce la solubilidad de los compuestos orgánicos de interés en la matriz [35,38]. Este aspecto es especialmente importante cuando se analizan compuestos polares en agua [35].

El ajuste del pH de la muestra permite obtener a los compuestos de interés, siendo estos ácidos o básicos, en su forma no ionizada, lo cual disminuye su afinidad por la matriz de la muestra [35,38]. Para asegurar en un 99%, que los compuestos de interés se encuentren en su forma neutra, el pH de la muestra debe ajustarse en dos unidades por encima o por debajo del pK_a del analito, según sea éste básico o ácido, respectivamente [35,40].

☞ **Agitación.** Por lo general, la agitación aumenta la masa recuperada y disminuye el tiempo de extracción, especialmente, para analitos de peso molecular alto con coeficiente de difusión alto [35,38].

☞ **Establecimiento del tiempo de equilibrio.** El tiempo de equilibrio determina el período experimental de extracción; este parámetro depende de los siguientes factores: la temperatura, la agitación, la afinidad de los analitos con la fase de extracción y de la solubilidad de éstos en la matriz. El tiempo, en el que la concentración del analito en la matriz y en la fase estacionaria se encuentra en equilibrio, se establece con un perfil de tiempo de extracción contra cantidad absorbida o adsorbida por el recubrimiento de la fibra (respuesta del detector medida como área en cuentas) [36,38].

1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL ANÁLISIS DE SAFROL

Como se pudo apreciar en los antecedentes, el método de análisis instrumental más utilizado para el análisis de safrol en bebidas es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), razón por la cual será también empleada para la realización de este trabajo. GC-MS combina la separación cromatográfica eficiente con la sensibilidad y especificidad de la espectrometría de masas.

La cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) es considerada un método de identificación el cual consiste en la separación cromatográfica del compuesto orgánico de interés y su posterior ionización en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas a presión reducida, en la que el compuesto es bombardeado por electrones de 70 eV de energía, emanados de un filamento de rutenio o tungsteno, resultando en la formación de un ión molecular con la suficiente energía para fragmentarse. Las corrientes iónicas reconstruidas de los iones fragmento y del ion molecular dan lugar al espectro de masas, que es como la “huella digital” para cada compuesto. El detector selectivo de masas puede operar de dos modos: *full scan* y *selective ion monitoring* (SIM); en el primero (*full scan* o barrido completo) se procesa en función del tiempo la corriente iónica total y, en el segundo (monitoreo de ion seleccionado), la corriente iónica parcial del fragmento de interés pre-seleccionado, lo que permite aumentar la sensibilidad del método.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS MATERIALES Y EQUIPOS

En la realización de la parte experimental se emplearon los reactivos, materiales y equipos, que se describen a continuación en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Descripción de los reactivos, materiales y equipos empleados.

PRODUCTO	ESPECIFICACIONES
Reactivos químicos:	
Metanol	Pureza: 99.9%; Lote N° 40570; <i>Fluka Chemie GmbH CH-9471. Buch, Switzerland.</i>
Safrol	Pureza: 97%; Catálogo N° S20-8; Lote N° 02220JU; <i>Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA.</i>
Cloruro de sodio	Pureza: 99.55%; Lote N° K30322804 210; <i>Merck KGaA, 64271. Darmstadt, Germany.</i>
Material de laboratorio:	
Viales	Viales ámbar estándar para SPME de 4 mL; <i>Supelco; Catálogo N° 27006.</i>
<i>Septa</i>	<i>Septa</i> de silicona blanca recubiertas con teflón blanco para viales de 15 mm x 45 mm; <i>Supelco; Catálogo N° 27369-U.</i>
Fibras para SPME	Fibras de sílice fundida recubiertas con PDMS/DVB de 65 μm , PDMS de 100 μm y PA de 85 μm ; <i>Supelco; Catálogo N° 57310-U, 57300-U y 57304, respectivamente.</i>

Dispositivo para SPME	Dispositivo para muestreo manual por SPME; <i>Supelco</i> , Catálogo N° 57330-U.
Gases especiales para GC	He, N ₂ , aire, H ₂ , pureza: 99.995%; AGA Fano S.A.
Vasos de precipitados	50 y 100 mL; <i>Schott</i> .
Balones aforados	2, 5 y 10 mL; KIMAX, USA.
Pipetas Pasteur	<i>Brand</i> ; Catálogo N° 7477 20.
Termómetro	
Micropipetas	2–20, 25–250 y 100–1000 µL; <i>Brand</i> , D-97864. <i>Wertheim</i> , Germany.

Equipo de laboratorio:

Manta de agitación y calentamiento	<i>Schott</i> , modelo MR 1065
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> , modelo AG285, exactitud ± 0.01/0.1
Balanza de precisión	<i>Sartorius</i> , modelo BA.310S, exactitud ± 0.1

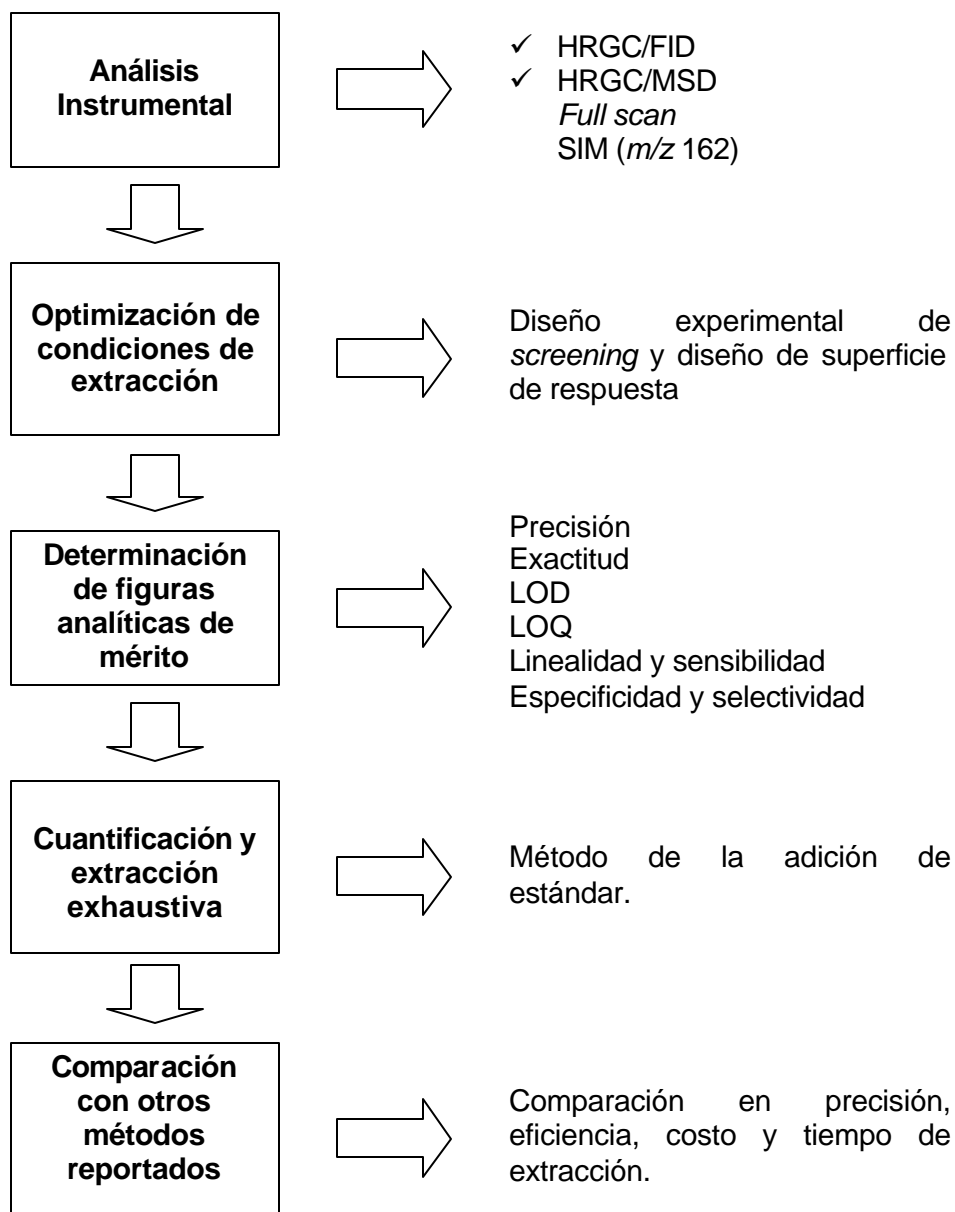
Análisis instrumental:

HRGC/MSD	Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard</i> HP 5890A Series II (Palo Alto, California, USA), dotado con un inyector <i>split/splitless</i> y acoplado a un detector selectivo de masas HP5972.
HRGC/FID	Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard</i> HP 5890 Series II (Palo Alto, California, USA), equipado con un inyector <i>split/splitless</i> y con un detector de ionización en llama (FID).

DESARROLLO DEL MÉTODO POR HS-SPME PARA LA DETERMINACIÓN DE SAFROL EN BEBIDAS TIPO COLA

A continuación, en la **Figura 7**, se muestra la metodología que se empleó en el presente trabajo.

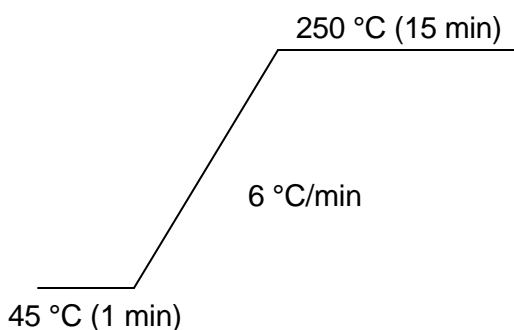
Figura 7. Diagrama general de la metodología empleada en el desarrollo y validación del método.



2.2 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

El desarrollo del método HS-SPME para la determinación de safrol en bebidas tipo Cola se llevó a cabo por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con detectores de ionización en llama y selectivo de masas, cuyas especificaciones se reportaron en la **Tabla 5**. El detector de ionización en llama (FID) se utilizó para el desarrollo del método por HS-SPME y el detector selectivo de masas (MSD) para la identificación y confirmación del safrol en bebidas tipo Cola.

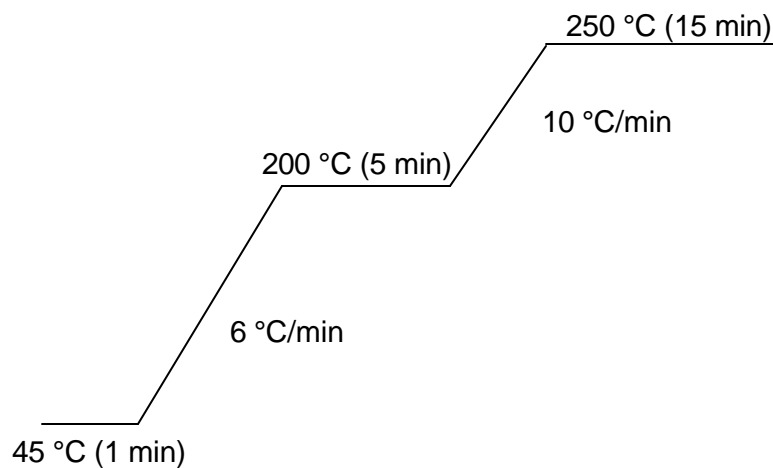
2.2.1 Análisis por HRGC/FID. Se empleó una columna capilar HP-5MS, con fase estacionaria 5%-fenil-[poli(dimetilsiloxano)], 30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e.). Los parámetros operacionales para el análisis fueron: el inyector se mantuvo a una temperatura de 250 °C con una relación *split* 1:10. La presión de helio en la entrada de la columna fue de 100 kPa, con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. Las velocidades de los gases de combustión fueron: 364 y 33.12 mL/min, para el aire y el hidrógeno, respectivamente. Como gas auxiliar se usó nitrógeno a 27.04 mL/min. El detector se operó a 250 °C. La temperatura del horno se programó desde 45 °C (1 min) hasta 250°C (15 min) con una rampa de calentamiento de 6 °C/min, así:



Los datos obtenidos se procesaron utilizando el *Software HP ChemStation 3365-II*.



2.2.2 Análisis por HRGC/MSD. Se utilizó una columna capilar HP-5MS, 5%-fenil-[poli(dimetilsiloxano)], 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μm (f.e.). La temperatura del horno se programó desde 50 °C (1 min) hasta 200 °C (5 min) con una rampa de calentamiento de 6 °C/min, luego a 10 °C/min hasta 250 °C durante 15 min, así:



Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: el inyector se operó a 250 °C con una relación *split* 1:30. La presión de helio a la entrada de la columna fue de 200 kPa, con una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 185 y 285 °C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue de 70 eV. El analizador másico cuadrupolar se operó en el modo *full scan* (barrido completo) y en el modo SIM (monitoreo del ion seleccionado, ion m/z 162).

Para la identificación inequívoca se utilizó el sistema de datos *Enhanced ChemStation* G1701 DA (Versión D.00.01.27), equipado con bibliotecas de espectros de masas, NBS75K y *Wiley* 138 de 75000 y 138000 espectros, respectivamente.



2.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL SAFROL DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción del analito de la matriz, se realizó una serie de experimentos, empleando la técnica de microextracción en fase sólida en el modo *headspace* en la muestra real; la bebida empleada para el desarrollo del método fue Coca-Cola (código de barras 7_702535_001745, presentación de 2 litros, S.N.M. 112263, producto elaborado por *the Coca-Cola Company*, por el grupo empresarial PANAMCO Colombia S.A., RSIAD19M08796), la cual fue adquirida en una tienda local.

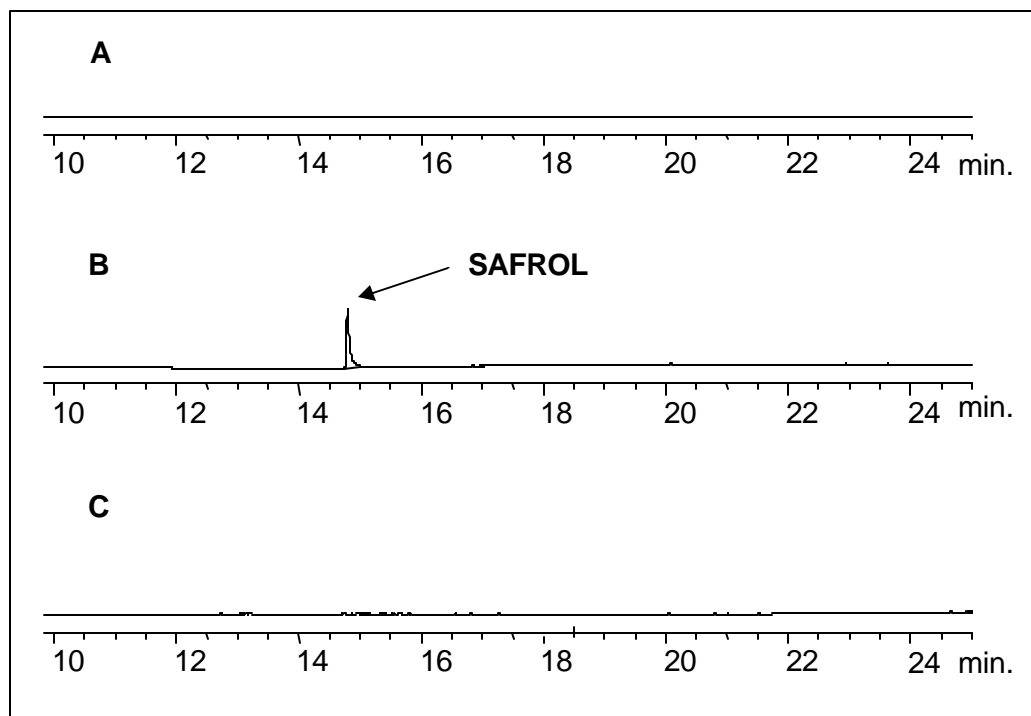


Primero, se escogió la fibra, que mayor cantidad de safrol extraía, y después se evaluaron los parámetros, que se presumía afectaban el proceso de extracción del safrol por SPME.

2.3.1 Selección del tipo de recubrimiento. Para seleccionar el recubrimiento se probaron tres tipos de fases estacionarias (cada una por triplicado): PDMS de 100 μm , PDMS/DVB de 65 μm y PA de 85 μm . La fibra se escogió comparando las respuestas del detector (medidas como áreas en cuentas) para el safrol extraído para cada uno de los tipos de fibra.

2.3.2 Evaluación de los parámetros de extracción. Una vez escogida la fibra, se procedió a evaluar las variables que podrían afectar el proceso de extracción del safrol de bebidas tipo Cola por HS-SPME. Para esta evaluación no se consideró el ajuste del pH, dada la forma no ionizada del safrol en la matriz. Tampoco se consideró la agitación, ya que se comprobó un efecto de memoria o *carry-over* en el micromagneto empleado, por retención de safrol, tal como se muestra en la **Figura 8**.

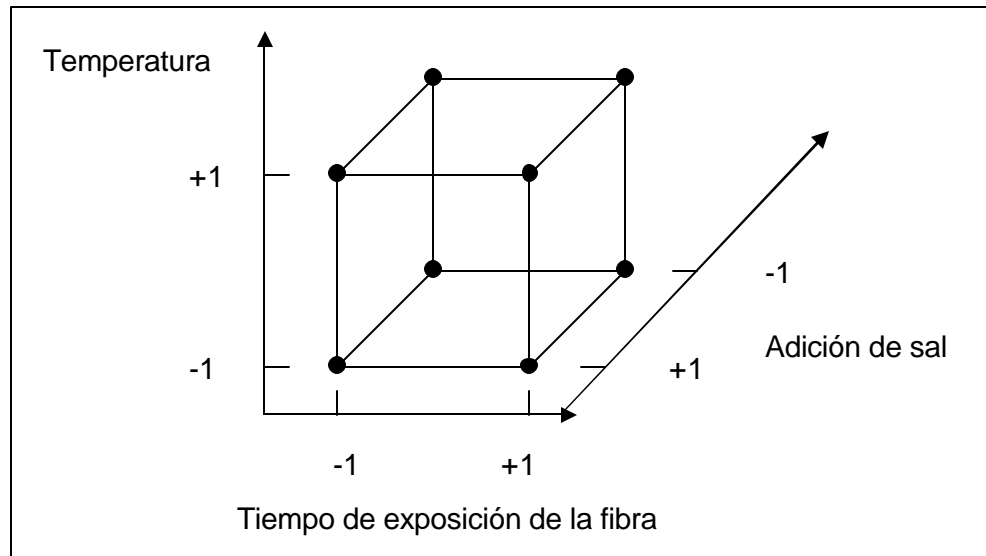
Figura 8. Perfiles cromatográficos de: **A** Blanco de fibra; **B**. Blanco de vial con magneto, para agitación de la muestra y **C**. Blanco de vial sin magneto.



En el análisis de los parámetros de extracción se utilizó un diseño experimental factorial completo a dos niveles o diseño de *screening* [42-44], el cual permitió determinar la significancia en la extracción de las variables evaluadas. Tales parámetros

considerados fueron: temperatura, tiempo de exposición de la fibra y adición de sal (efecto *salting out*). A continuación, en la **Figura 9**, se presenta el diseño de *screening* empleado.

Figura 9. Presentación del diseño factorial completo a dos niveles 2^3 .



Los niveles máximos (codificados como +) y mínimos (codificados como -) de las variables, usados en el diseño experimental se indican en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Niveles de las variables evaluadas.

Niveles codificados	Temperatura, °C	Tiempo de exposición de la fibra, min	Adición de sal, %p/v
-1	23	5	0
+1	60	30	30

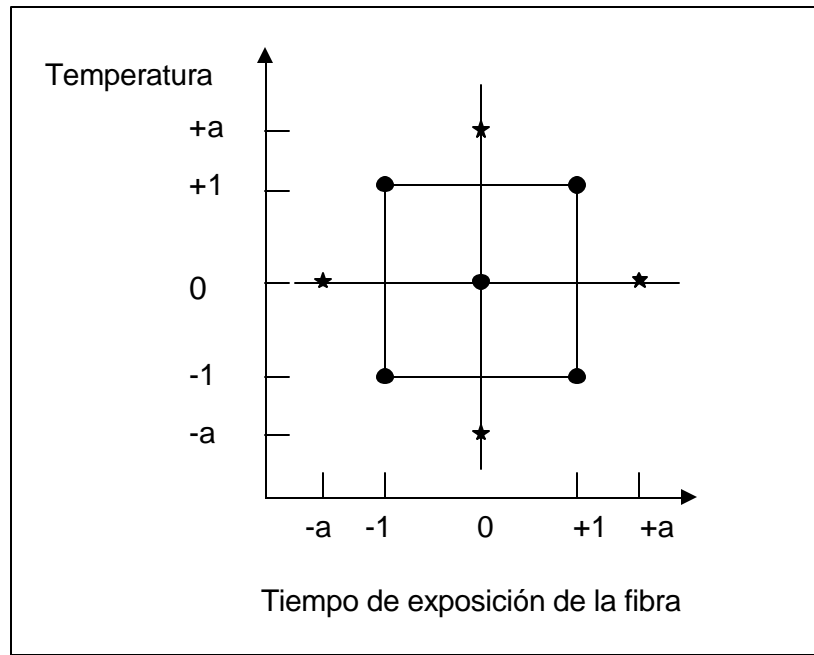
El diseño experimental de *screening* factorial completo 2^3 utilizado se detalla en la **Tabla 7**, donde cada experimento se ha realizado por duplicado y aleatoriamente.

Tabla 7. Diseño factorial completo 2^3 .

Experimento	Temperatura	Tiempo de exposición de la fibra	Adición de sal
1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1
3	-1	+1	+1
4	-1	-1	-1
5	+1	-1	+1
6	-1	-1	+1
7	+1	+1	+1
8	-1	+1	-1

2.3.3 Determinación de las condiciones óptimas de extracción. Las variables que demostraron un efecto significativo en el proceso de extracción del safrol por HS-SPME (temperatura y tiempo de exposición de la fibra), fueron optimizadas con base en un diseño de superficie de respuesta: compuesto central 2^2 + estrella, rotatorio [42]. En la **Figura 10** se presenta el diseño en mención.

Figura 10. Presentación del diseño compuesto central 2^2 + estrella.



Los niveles de las variables, temperatura y tiempo de exposición de la fibra, usados en el diseño de optimización se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Niveles de las variables optimizadas.

Niveles codificados	Temperatura, °C	Tiempo de exposición de la fibra, min
-1.68 ¹	32	1.0
-1	40	6.0
0	60	18
+1	80	30
+1.68 ¹	88	35

¹ Niveles adicionales para la condición de rotabilidad

A continuación, en la **Tabla 9**, se detalla el diseño compuesto central 2^2 + estrella rotatorio, utilizado en la optimización de las condiciones de extracción, donde se realizaron cinco réplicas en el punto central del diseño, para estimar el error experimental.

Tabla 9. Diseño compuesto central 2^2 + estrella.

Experimento	Temperatura	Tiempo de exposición de la fibra
1	0	0
2	0	0
3	0	+1.68
4	-1	+1
5	0	0
6	+1.68	0
7	0	0
8	-1	-1
9	-1.68	0
10	+1	+1
11	0	-1.68
12	0	0
13	+1	-1

Para el análisis de los diseños experimentales descritos se usó la metodología de superficie de respuesta con ayuda del *Software* estadístico STATGRAPHICS *Plus* 5.1, para Windows.

2.4 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

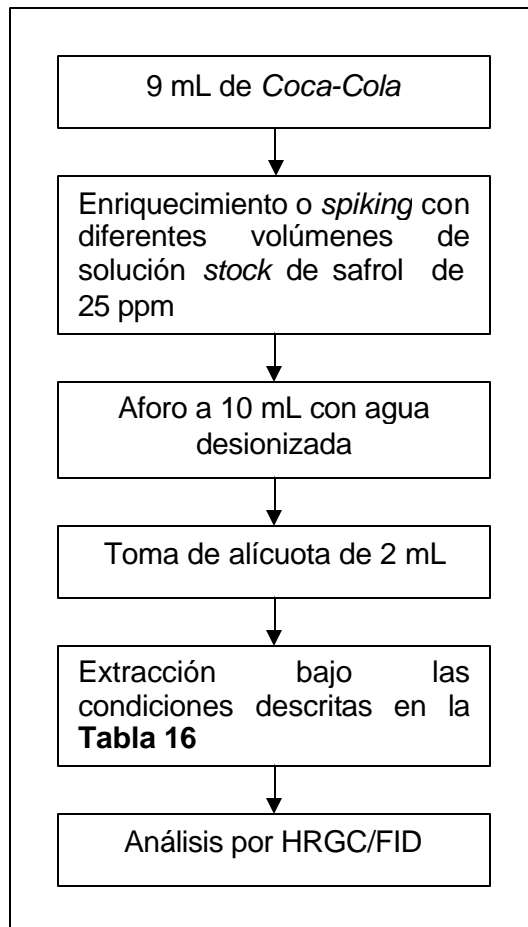
Se determinaron figuras analíticas de mérito [45], tales como: precisión (expresada como repetibilidad), exactitud (reportada como porcentaje de recuperación), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad y sensibilidad y, especificidad y selectividad; según lo recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización de requerimientos técnicos para registro de fármacos para uso humano (ICH) [46].

Para la determinación de estos parámetros, se realizó una curva de calibración por el método de adición de estándar en el rango de 0-1000 ppb. Esta técnica consistió en el enriquecimiento de la muestra real con diferentes cantidades del analito de interés; se recomienda para matrices complejas, cuando no se dispone de un blanco o cuando se dispone de uno que varía enormemente en el tipo y el número total de compuestos presentes [47]. La cuantificación basada en la adición de estándar, se ha utilizado para la caracterización de vodkas, en el análisis de aditivos del tabaco usado para cigarrillos y para el estudio de los productos de la peroxidación lipídica de la leche [39].

Solución stock: se preparó una solución *stock* de 25 ppm de safrol en metanol / agua (1:800). Las especificaciones de los reactivos aparecen en la **Tabla 5**.

Soluciones de trabajo: las soluciones de trabajo se prepararon a partir de la solución *stock*, de acuerdo con el protocolo recomendado para el método de adición de estándar [47, 48]; este procedimiento se describe a continuación en la **Figura 11**.

Figura 11. Procedimiento de preparación de soluciones de trabajo, empleadas en la curva de calibración por el método de adición de estándar.



Los volúmenes de la solución *stock* empleados en la preparación de las soluciones de trabajo se detallan a continuación en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Cantidad de solución *stock* de safrol empleada en la preparación de las soluciones de trabajo.

Concentración, ppb	Volumen de <i>stock</i> , μL	Cantidad añadida de safrol, ng
0	0	0
5	2.00	50
17	6.80	170
25	10.0	250
37	14.8	370
50	20.0	500
100	40.0	1000
250	100	2500
500	200	5000
1000	400	10000

2.4.1 Evaluación de la repetibilidad del método para tiempo de retención (t_R) y área. La repetibilidad del método [49] se evaluó en términos del porcentaje de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV) de la medición del t_R y del área, para cada una de las soluciones de calibración. Para el tratamiento estadístico de los datos se calcularon parámetros de calidad, a saber: promedio (\bar{X}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV). Las ecuaciones [48] empleadas fueron:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100\%$$

Donde:

\bar{X} = Valor promedio;

X_i = Valor parámetro (t_R o área);
 n = Número de mediciones;
 S = Desviación estándar;
CV = coeficiente de variación (%).

La repetibilidad, medida como CV, se calculó con base en la siguiente relación [49]:

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_r$$

Donde:

r = Repetibilidad;

t = 2.26 (t de *Student* para un nivel de confianza de 95 %) [47];

S_r = Desviación estándar de la repetibilidad.

2.4.2 Evaluación de la eficiencia del método. La eficiencia del método desarrollado se evaluó con base en el porcentaje de recuperación, donde la muestra de Coca-Cola se enriqueció con 300 ng de safrol (12 μ L de solución *stock* de safrol de 25 ppm); el experimento se realizó por triplicado.

El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación [49].

$$\% \text{Recuperación} = \frac{C_x}{C_m} \times 100$$

Donde:

C_x = Cantidad de safrol, obtenida experimentalmente después de la extracción;

C_m = Cantidad añadida de safrol.

2.4.3 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método. La linealidad y la sensibilidad del método se evaluaron mediante la curva de calibración realizada por el método de adición de estándar, tal como se describió en la parte inicial de la **Sección 2.4**; la curva fue obtenida en el intervalo de 0-1000 ppb, con 10 niveles de concentración, el doble de lo mínimo recomendado (5 concentraciones) por ICH [45]. La

linealidad se reportó como el coeficiente de correlación [49] y como la desviación estándar de la pendiente de la línea de regresión [45]. La desviación estándar tanto de la pendiente, como de la ordenada en el origen, se calculó con base en las siguientes expresiones [46,47]:

Para una ecuación de la recta de la forma $Y = bx + a$:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\left[\sum_i (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2}} \quad S_a = S_{y/x} = \left[\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2} \right]^{1/2}$$

$$S_{y/x} = \left[\frac{\sum_i (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

Donde:

X_i = Concentración de safrol;

\bar{X} = Promedio de la concentración;

$(Y_i - \hat{Y}_i)$ = Residuo de la señal;

n = Número de determinaciones.

La sensibilidad se reportó como el coeficiente angular o la pendiente de la curva de calibración a un límite de confianza determinado, de acuerdo con la siguiente expresión [47]:

$$b \pm tS_b$$

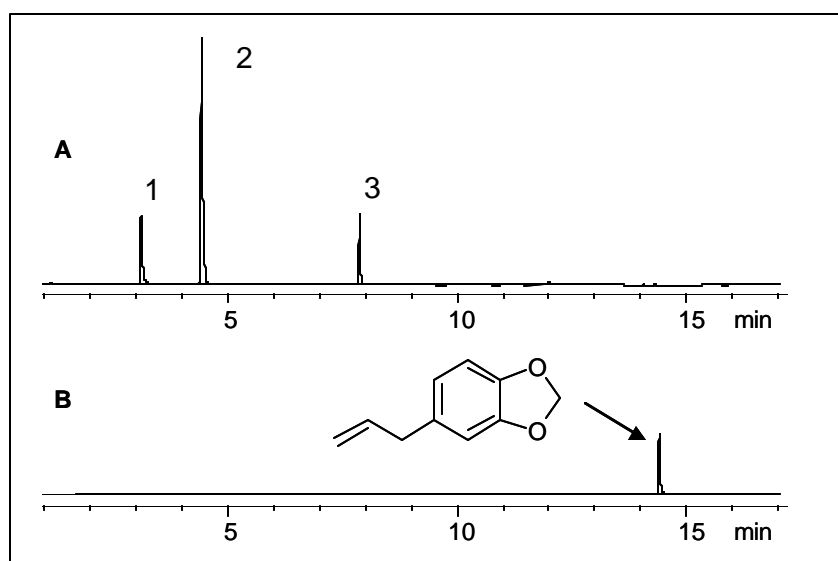
Donde: $t = 2.31$ (t de *Student* para un nivel de confianza del 95 %).

2.4.4 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para el safrol, por HRGC/FID. Para la determinación del LOD se usó como blanco una

bebida sin safrol (ver **Figura 12**): gaseosa *Crush Tropical* (código de barras 7_702535_003411, presentación de 500 mL, producto elaborado bajo autorización de *CS Beverages Limited*, por grupo empresarial PANAMCO Colombia S.A., RSAD 19/1904).



Figura 12. Perfiles cromatográficos de: **A.** Bebida usada como blanco: *Crush Tropical*, volátiles obtenidos por HS-SPME y HRGC/FID y **B.** Patrón de safrol.



1. Butirato de etilo; **2.** Acetato de 3-metilbutilo; **3.** Limoneno.

El LOD se determinó con un 95 % de nivel de confianza como la concentración que proporciona una señal (Y) en el detector significativamente diferente de la señal del blanco, de acuerdo con la siguiente expresión [47]:

$$Y = Y_B + KS_B$$

Donde:

Y_B = Promedio de la señal del blanco;

S_B = Desviación estándar de la señal del blanco;

$K = 3$, para un nivel de confianza del 95 %.

El límite de cuantificación, LOQ, se definió como el doble del LOD (LOQ = 2 LOD) [50].

2.4.5 Evaluación de la especificidad y la selectividad del método. La especificidad [45] y la selectividad [49] del método se evaluaron según lo recomendado por los protocolos de validación de métodos por medio del acoplamiento GC/MS, donde por exploración de las corrientes iónicas, se evaluó la homogeneidad del pico cromatográfico y se realizó la identificación inequívoca del safrol en bebidas tipo Cola.

El espectrómetro de masas se operó en el modo de barrido completo (*full scan*) y en el modo de monitoreo del ión seleccionado (SIM), donde el ion m/z 162 fue escogido, ya que es fragmento “diagnóstico”, ion molecular, y presenta una intensidad de 100 % en el espectro de masas del safrol [29-31]. Las condiciones operaciones del equipo se describieron en la **Sección 2.2.2** de la Parte Experimental.

2.5 ANÁLISIS DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME Y HRGC/FID.

Se analizaron bebidas tipo Cola tales como *Coca-Cola* y *Pepsi-Cola*, por el método desarrollado por HS-SPME, bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 16**. Las muestras se conservaron a 4 °C desde el momento de su adquisición hasta su análisis.

Las bebidas gaseosas se adquirieron de una tienda de la localidad. A continuación, se detallan cada una de las presentaciones analizadas:



- ✓ Coca-Cola tradicional, presentación de 600 mL; código de barras 7_702535_001752, S.N.M. 112264, producto elaborado bajo autorización de *the Coca-Cola Company* por grupo empresarial PANAMCO Colombia S.A., RSIAD 19M08796.
- ✓ *Pepsi* tradicional, presentación de 300 mL; código de barras 7_702090_020885, bebida gaseosa sabor Kola, pepsicola, producida por gaseosas LUX S.A., bajo autorización de *Pepsico INC. PURCHASE N.Y. E.U.A.* RSAA 19/00498.
- ✓ Coca-Cola *Light*, presentación de 500 mL; código de barras 7_702535_002759, S.N.M. 112264, producto elaborado bajo autorización de *the Coca-Cola Company* por grupo empresarial PANAMCO Colombia S.A., RSIAD 19M08896.
- ✓ *Pepsi Light*, presentación de 300 mL; código de barras 7_702090_020953, bebida gaseosa sabor Kola, pepsicola, producida por gaseosas LUX S.A., bajo autorización de *Pepsico INC. PURCHASE N.Y. E.U.A.* RSAA 19/00598.

2.5.1 Cuantificación del safrol en bebidas tipo Cola. La cuantificación del safrol en las bebidas tipo Cola anteriormente mencionadas se llevó a cabo por el método de adición de estándar, descrito al inicio de la **Sección 2.4**. Se determinó la cantidad de

safrol (X) en cada una de las presentaciones como la masa en ng correspondiente a la señal del detector sin enriquecer la muestra de Coca-Cola, de acuerdo con la siguiente expresión [47]:

Para una ecuación de la recta de la forma $Y = bx + a$:

$$X = \frac{a}{b}$$

Donde:

X = Cantidad (ng) de safrol en la muestra;

a = Ordenada en el origen;

b = Pendiente de la recta de regresión.

La desviación típica de la cantidad (X) estimada, se calculó con base en la siguiente ecuación [47]:

$$S_x = \frac{S_{y/x}}{b} \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{Y}^2}{b^2 \sum (X_i - \bar{X})^2} \right]^{1/2}$$

Donde:

S_x = Desviación estándar de la cantidad de safrol calculada;

\bar{Y} = Promedio de la respuesta del detector;

X_i = Cantidad (ng) añadida de safrol;

\bar{X} = Promedio de X_i ;

n = Número de puntos de la curva.

$S_{y/x}$, b: Ver **Sección 2.4.3**.

El resultado se reportó con su respectivo límite de confianza, de acuerdo con la siguiente expresión [47]:

$$X \pm t S_x$$

Donde: $t = 2.31$ (t de *Student* para un nivel de confianza del 95%).

∅ **Extracción exhaustiva de safrol de bebidas tipo Cola por HS-SPME.** La extracción exhaustiva se llevó a cabo bajo las condiciones más favorables para la extracción del safrol en bebidas tipo Cola, por HS-SPME (fibra de PDMS-100 μm , 48 °C y 30 min de extracción), con la siguiente modificación: una vez retirado el dispositivo para SPME del vial, que contenía la muestra, se tapaba inmediatamente el *septum* perforado, utilizado para el muestreo, con otro *septum* (para vial de 2 mL), para evitar las posibles pérdidas del analito. La fibra de PDMS-100 μm se expuso al HS de la bebida en repetidas ocasiones hasta prácticamente la desaparición del pico cromatográfico del safrol del perfil de la bebida.

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración del safrol en el rango de 24-159 ppm. Se preparó una solución *stock* de 318 ppm de safrol en metanol, a partir de la cual se prepararon las soluciones de trabajo de 24, 48, 64, 79, 159 ppm (147, 294, 392, 490 y 980 μM). Los volúmenes de la solución *stock* empleados en la preparación de las soluciones de trabajo fueron 75, 150, 200, 250 y 500 μL , respectivamente. La cantidad de safrol extraída en cada etapa de la extracción exhaustiva se determinó con base en la relación entre el área cromatográfica y la pendiente de la curva de calibrado.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La metodología general empleada, en el desarrollo del método por HS-SPME para la determinación de safrol en bebidas tipo Cola se describió en la **Figura 7**.

3.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL SAFROL DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME

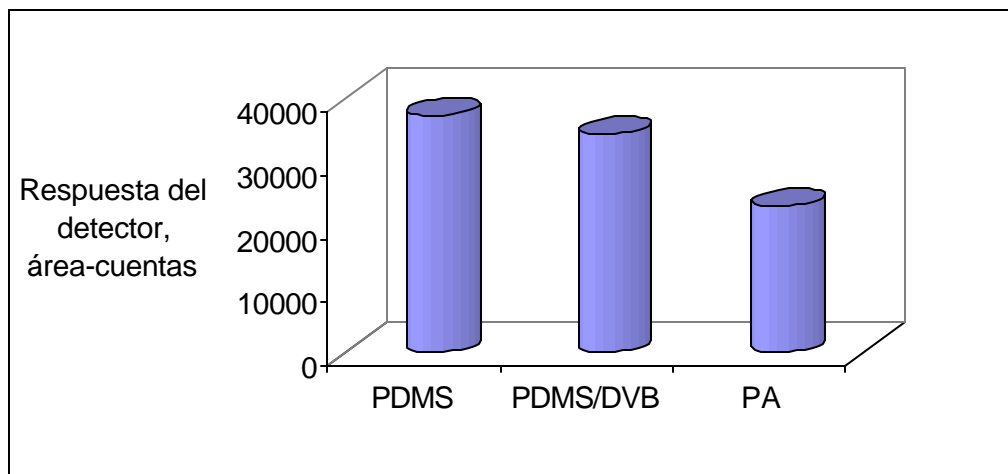
El procedimiento seguido para la optimización de las condiciones de extracción del safrol de bebidas tipo Cola por HS-SPME se describió en la **Sección 2.3** de la Parte Experimental.

3.1.1 Selección del tipo de recubrimiento. La eficiencia de extracción del safrol, empleando diferentes tipos de fases estacionarias se muestra en la **Tabla 11** y se ilustra gráficamente en la **Figura 13**.

Tabla 11. Extracción de safrol, empleando diferentes tipos de fibra.

Fibra	Promedio de respuesta, FID-área-cuentas (n=3)	Coefficiente de variación, % (n=3)
PDMS	37400	1.94
PDMS/DVB	34500	6.8
PA	23000	9.96

Figura 13. Eficiencia de las fases estacionarias PDMS-100 μm , PDMS/DVB- 65 μm y PA- 85 μm en la extracción de safrol de bebidas tipo Cola, por HS-SPME.



Con base en los resultados mostrados en la **Tabla 11** y la **Figura 13** se seleccionó el recubrimiento PDMS- 100 μm para realizar el montaje de la técnica, ya que presenta mayor eficiencia y menor variabilidad en la extracción.

3.1.2 Evaluación de los parámetros de extracción. Los resultados obtenidos del diseño de *screening* factorial completo 2^3 se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados obtenidos del diseño experimental de *screening* factorial completo 2³.

Experimento	Niveles codificados			Promedio de respuesta del detector, área-cuentas
	Temperatura	Tiempo de exposición	Adición de sal	
1	+	-	-	15814.2
2	+	+	-	39516.3
3	-	+	+	15687.0
4	-	-	-	5394.94
5	+	-	+	21452.8
6	-	-	+	4001.67
7	+	+	+	37712.7
8	-	+	-	17293.1

El análisis de varianza, ANOVA (**Tabla 13**) para la respuesta permitió evaluar estadísticamente la significancia de las variables estudiadas [43]: temperatura, tiempo de exposición de la fibra y adición de sal (efecto *salting out*).

Tabla 13. Análisis de varianza, ANOVA para la respuesta del detector (área-cuentas).

Variable	Efecto ¹	Suma de cuadrados = cuadrado medio ²	Relación F	Valor p
A: Temperatura	18029.8	1.3003 E9	72.04	0.0000
B: Tiempo exp.	15886.4	1.0095 E9	55.93	0.0001
C: Adición sal	208.893	1.7454 E5	0.01	0.9241

¹ La desviación típica de efecto es ± 2124.23

² Cuadrado medio = suma de cuadrados / grados de libertad (g.l.= 1)

Tal como se aprecia en la **Tabla 13**, de las variables estudiadas, sólo la temperatura (A) y el tiempo de exposición de la fibra (B) tienen un efecto significativo en el proceso de extracción del safrol de bebidas tipo Cola por HS-SPME; ya que sólo A y B tienen valores p (nivel de significancia) menores de 0.05, indicando que son significativamente diferentes en un nivel de confianza de 95.0%.

3.1.3 Determinación de las condiciones óptimas de extracción. Los resultados obtenidos del diseño de superficie de respuesta: compuesto central 2^2 + estrella rotatorio, se muestran en la **Tabla 14**.

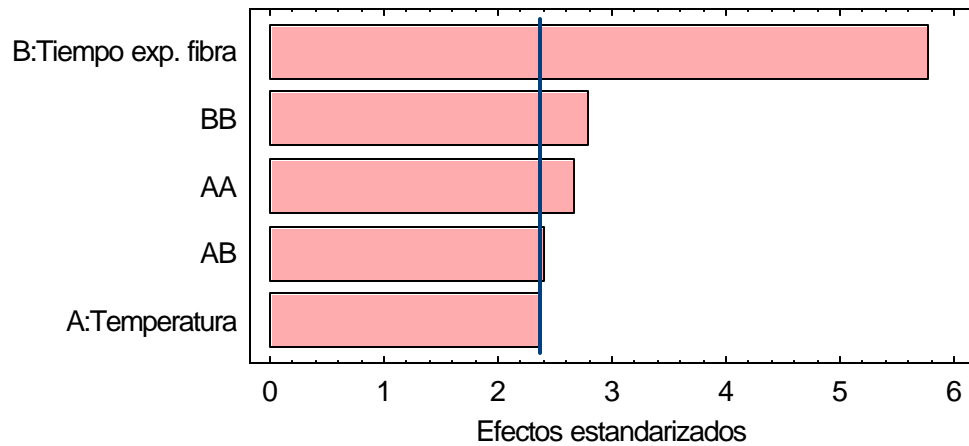
Tabla 14. Resultados obtenidos del diseño compuesto central 2^2 + estrella rotatorio.

Experimento ¹	Niveles codificados		Respuesta del detector, área-cuentas
	Temperatura	Tiempo exposición de la fibra	
1	0	0	15149.1
2	0	0	13919.9
3	0	+1.68	13005.2
4	-1	+1	18805.2
5	0	0	12454.3
6	+1.68	0	7207.48
7	0	0	13978.0
8	-1	-1	7106.38
9	-1.68	0	10729.3
10	+1	+1	11724.1
11	0	-1.68	4658.07
12	0	0	12538.9
13	+1	-1	8029.59

¹ Los experimentos 1,2,5,7 y 12 son las réplicas del punto central del diseño.

El análisis de varianza permitió determinar la importancia de los efectos estudiados, tal como se visualiza en el diagrama de Pareto (**Figura 14**), donde se muestran en orden decreciente de magnitud; la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado / error estándar). Las barras, que se extienden más allá de la línea, corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95 % [42].

Figura 14. Diagrama de Pareto para la respuesta del detector (área-cuentas).



El R^2 estadístico indica que el modelo así ajustado explica el 89 % de la variabilidad en el área; de la misma manera, el R^2 estadístico ajustado, el cual es adecuado para comparar números diferentes de variables independientes, es 81 %, donde el error estándar del estimado es igual a 1670.32.

A continuación, en la **Tabla 15** se muestran los coeficientes de la ecuación de regresión, que se ajusta a los datos del modelo generado para la optimización de las condiciones de extracción.

Tabla 15. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo generado para la optimización de las condiciones de extracción.

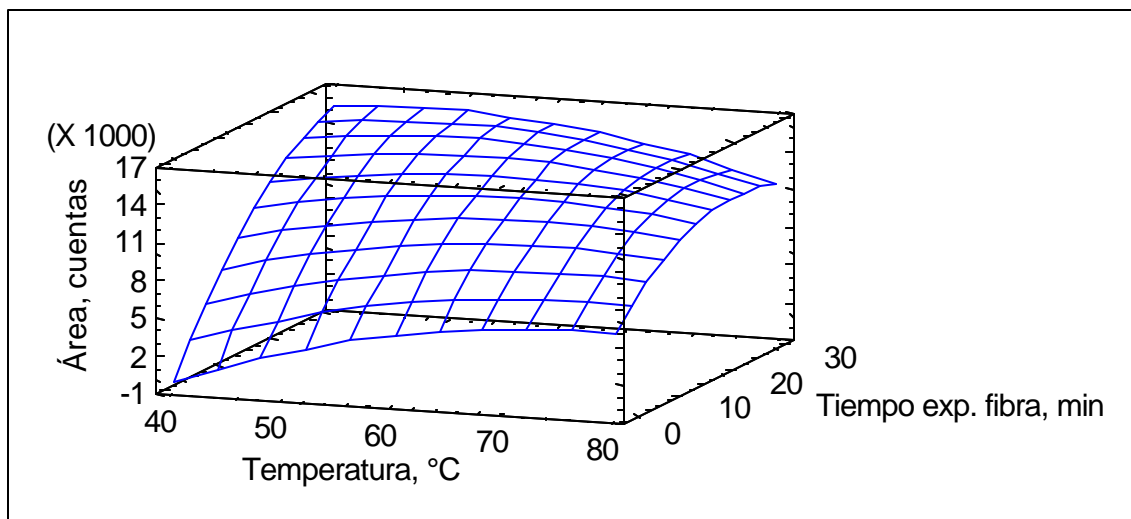
Variable	Coefficiente
A: Temperatura	657.305
B: Tiempo de exposición de la fibra	1223.36
AA	-4.22687
AB	-8.33782
BB	-12.2162
Constante	-19671.2

De tal manera, la ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Área} = -19671.2 + 657.305 A + 1223.36 B - 4.226787 A^2 - 8.33782 AB - 12.2162 B^2$$

La superficie de respuesta para el área se muestra en la **Figura 15**. Los valores de áreas que soportan esta gráfica aparecen en el **Anexo 1**.

Figura 15. Superficie de respuesta para el área.



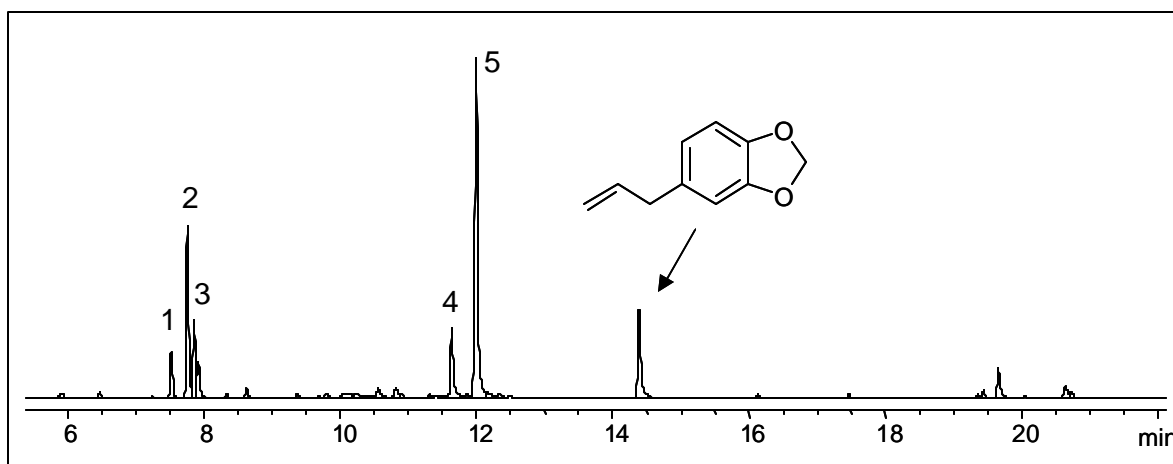
Con base en este modelo se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción del safrol en bebidas tipo Cola, por HS-SPME (**Tabla 16**), en la región experimental estudiada.

Tabla 16. Condiciones más favorables para la extracción del safrol de bebidas tipo Cola, por HS-SPME.

Parámetro	Especificaciones
Tipo de recubrimiento	PDMS – 100µm
Temperatura	48 °C
Tiempo de exposición de la fibra	30 min
Volumen de muestra	2 mL

A continuación, en la **Figura 16**, se muestra un perfil cromatográfico de los volátiles de la bebida Coca-Cola, obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 16**.

Figura 16. Perfil cromatográfico de los volátiles de la Coca-Cola, obtenidos por HS-SPME (fibra de PDMS-100 µm, 48 °C y 30 min de extracción) y HRGC/FID.



1. *p*-Cimeno; 2. Limoneno; 3. Eucaliptol; 4. 4-Metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol; 5. Propanato de linalilo.

3.2. DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

El procedimiento seguido para la determinación de las figuras analíticas de mérito del método, se describió en la **Sección 2.4** de la Parte Experimental.

3.2.1 Evaluación de la repetibilidad del método para tiempo de retención (t_R) y área. Los resultados obtenidos para la evaluación del método en t_R y área se detallan en las **Tablas 17** y **18**, respectivamente.

Tabla 17. Evaluación de la repetibilidad de t_R del safrol, por HRGC/FID.

Concentración añadida, ppb	Tiempo de retención, min			
	t_R	Promedio	S	CV, %
0	14.398	14.39	3.5 E-3	0.02
	14.393			
5	14.401	14.39	4.2 E-3	0.03
	14.395			
17	14.399	14.40	6.4 E-3	0.04
	14.408			
25	14.394	14.39	2.1 E-3	0.01
	14.397			
37	14.401	14.40	1.4 E-3	0.01
	14.399			
50	14.403	14.40	3.5 E-3	0.02
	14.398			
100	14.404	14.38	1.4 E-3	0.01
	14.395			
250	14.383	14.38	1.4 E-3	0.01
	14.381			
500	14.396	14.39	2.1 E-3	0.01

	14.393			
1000	14.417	14.41	6.4 E-3	0.04
	14.408			
Repetibilidad, %				Sr = 0.01
				r = 0.04

Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad del área (cuentas) del safrol, por HRGC/FID.

Concentración añadida, ppb	Área, cuentas			
	Área	Promedio	S	CV, %
0	2425.15	2390	5.1 E1	2.1
	2353.38			
5	3099.01	3300	3.2 E2	9.8
	3558.60			
17	4616.92	4700	1.5 E2	3.2
	4830.83			
25	6766.35	6600	2.9 E2	4.5
	6348.36			
37	8131.56	8500	5.5 E2	6.4
	8905.33			
50	11204.2	10500	9 E2	8.9
	9869.84			
100	17932.4	17000	1 E3	6.2
	16425.6			
250	35230.8	33000	3 E3	7.8
	31529.5			
500	62657.9	62900	3 E2	0.5
	63137.5			
1000	134184.8	129000	8 E3	6.2
	122860.5			
Repetibilidad, %				Sr = 2.9
				r = 9.3

Tal como se muestra en las **Tablas 17 y 18**, se obtuvo una repetibilidad de 0.04% para el t_R y de 9.3% para el área, lo que demuestra la precisión del método según Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) [51], que establece un valor máximo permisible de 2 y 10% para estos parámetros, respectivamente [49].

Por lo tanto, se confirma la idoneidad del sistema analítico (*system suitability*) para el método desarrollado, dada la buena repetibilidad de los t_R y área, anteriormente mencionados.

3.2.2 Evaluación de la eficiencia del método. Los resultados obtenidos de la evaluación de la eficiencia del método, expresada como porcentaje de recuperación del safrol de las muestras de Coca-Cola enriquecidas, aparecen en la **Tabla 19**. En el **Anexo 2** se muestran las áreas cromatográficas obtenidas para cada ensayo de eficiencia del método.

Tabla 19. Evaluación de la eficiencia del método.

Cantidad añadida de safrol, ppb	Recuperación, %			
	Recuperación	Promedio	S	CV, %
	96			
30	96	94	4.0	4.3
	89			
Recuperación	94 ± 4.0 %			

El método desarrollado por HS-SPME para la extracción del safrol en bebidas tipo Cola, con una recuperación de 94 ± 4.0 %, demostró buena exactitud, según lo recomendado

por la literatura, donde porcentajes de recuperación en el rango 70-120 %, son aceptados [49].

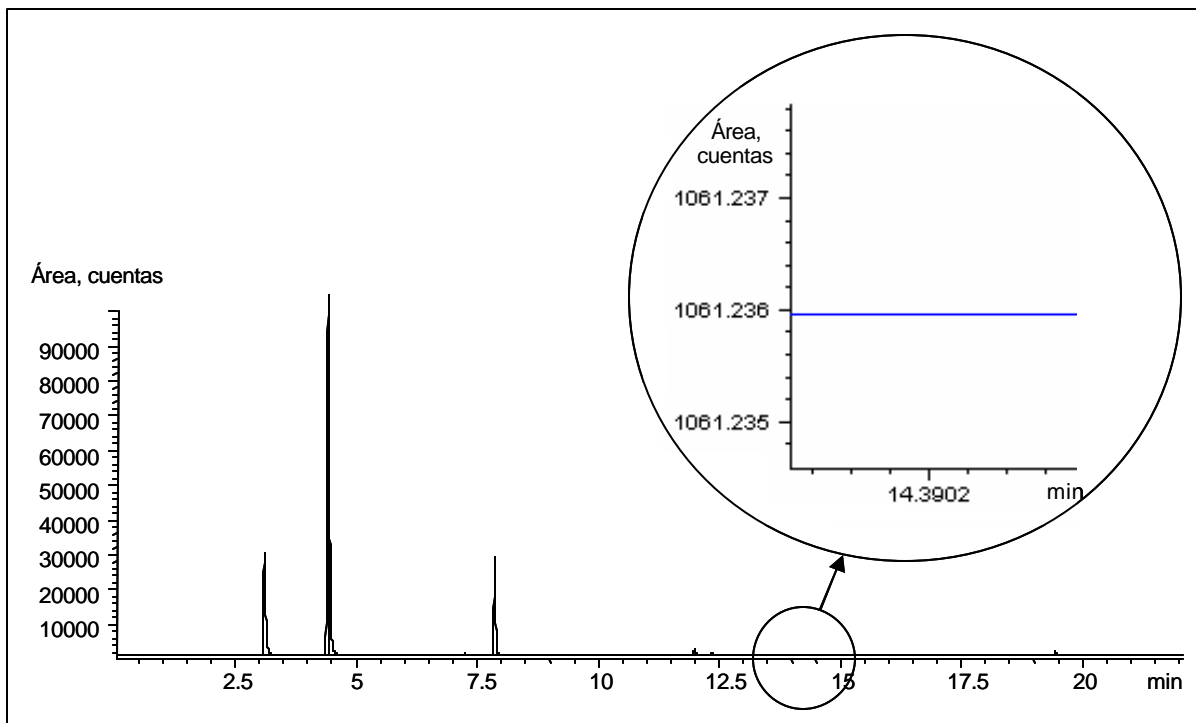
3.2.3 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método, mediante la curva de calibración (Ver **Anexo 3**) realizada, se muestran a continuación:

Ecuación de la curva de calibración:	$Y = 12.421x + 3159.6$
Cuadrado del coeficiente de correlación:	$R^2 = 0.9991$
Pendiente (b):	$b = 12.421$
Desviación estándar de b:	$S_b = 1.3 \text{ E-1}$
$b \pm t S_b$:	$12.421 \pm 3 \text{ E-1}$
Ordenada en el origen (a):	$a = 3159.6$
Desviación estándar de a:	$S_a = 4.8 \text{ E2}$
$a \pm t S_a$:	$3159.6 \pm 1.1 \text{ E3}$

Se demostró una buena linealidad y una alta sensibilidad del método, bajo el rango de concentración evaluado (15.6-1000 ppb), ya que la desviación estándar de la pendiente (1.3 E-1) demuestra la precisión de la curva de calibración, así mismo, el cuadrado del coeficiente de correlación obtenido (0.9991) es aceptado según la guía de validación de métodos analíticos [52]. Ello permite concluir, que el método es aplicable bajo el intervalo de concentración mencionado.

3.2.4 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para el safrol por HRGC/FID. Los criterios utilizados para la determinación del LOD y del LOQ se describieron en la **Sección 2.3.4** de la Parte Experimental. A continuación, en la **Figura 17** se muestra en detalle la señal generada por la bebida usada como blanco, cuyo promedio y desviación estándar permitieron calcular una señal significativamente diferente de la señal del blanco con un 95 % de confianza, cuya concentración correspondió al LOD.

Figura 17. Detalle de la señal generada por la bebida usada como blanco.

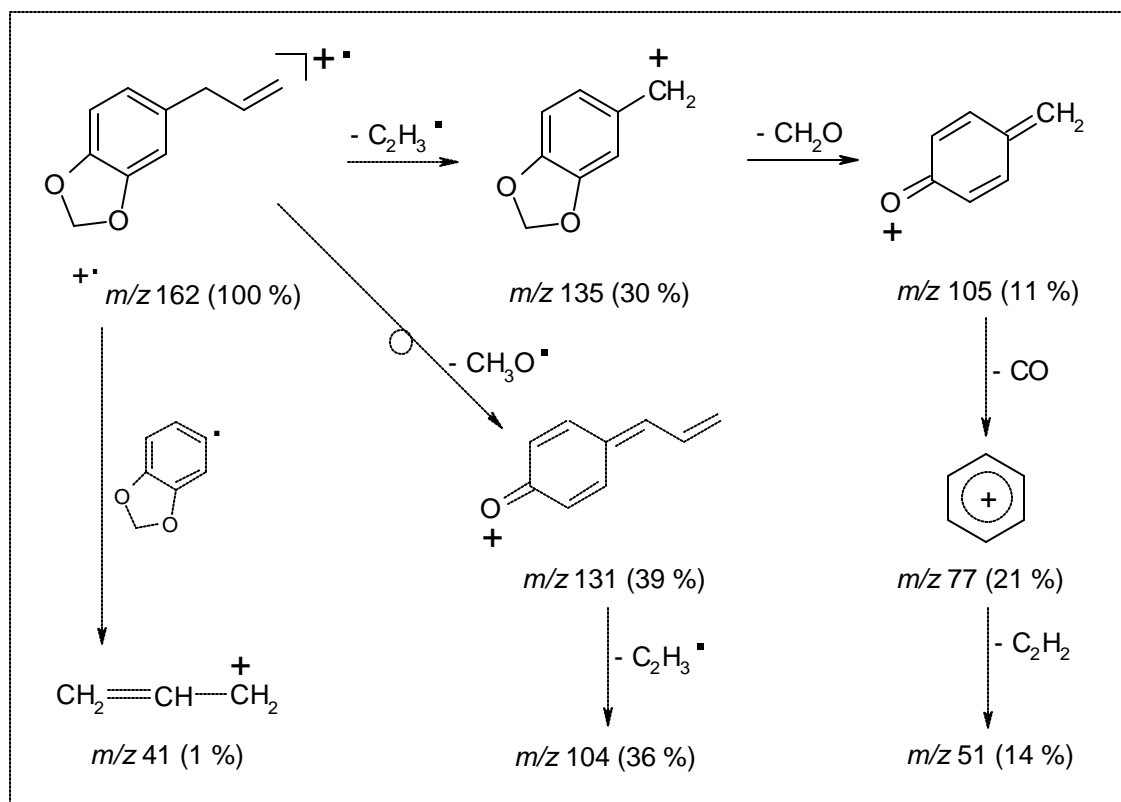
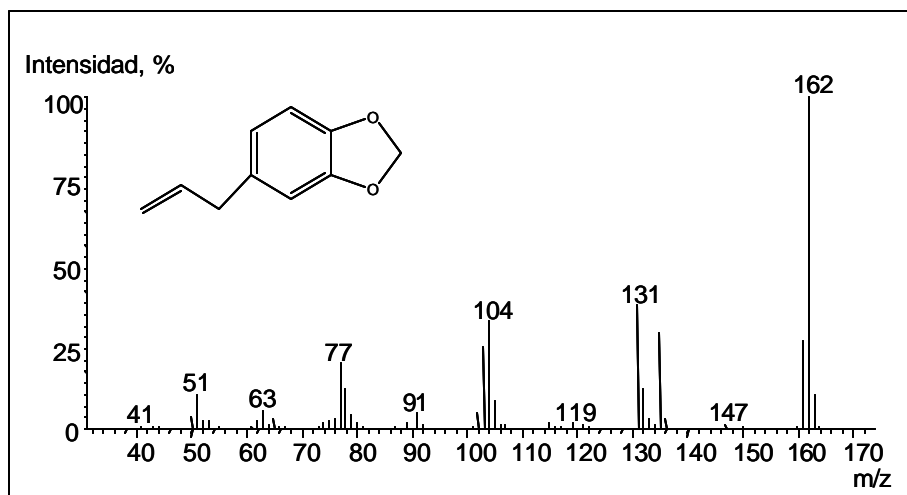


Se obtuvo un LOD de 78 ng (7.8 ppb) y un correspondiente LOQ de 156 ng (15.6 ppb) para el safrol, por HS-SPME y HRGC/FID.

3.2.5 Evaluación de la especificidad y la selectividad del método. El análisis por GC/MS permitió la identificación inequívoca del safrol en las bebidas tipo Cola, donde la exploración del pico correspondiente a la corriente iónica del safrol, permitió comprobar la homogeneidad o pureza del pico cromatográfico, y, por lo tanto, la especificidad y selectividad del método desarrollado.

La identificación espectroscópica se llevó a cabo analizando el patrón de fragmentación obtenido para el safrol (**Figura 18**), y comparándolo con el espectro de safrol registrado en la Base de Datos de espectros de masas.

Figura 18. Espectro de masas del safrol (EI, 70 eV).



3.3 ANÁLISIS DE BEBIDAS TIPO COLA POR HS-SPME y HRGC/FID

Los perfiles cromatográficos de las bebidas tipo Cola (*Coca-Cola* y *Pepsi-Cola*) analizadas se muestran a continuación en las **Figuras 19** y **20**, respectivamente.

Figura 19. Perfiles cromatográficos, obtenidos por HRGC/FID de: **A.** *Coca-Cola* tradicional y **B.** *Coca-Cola light*.

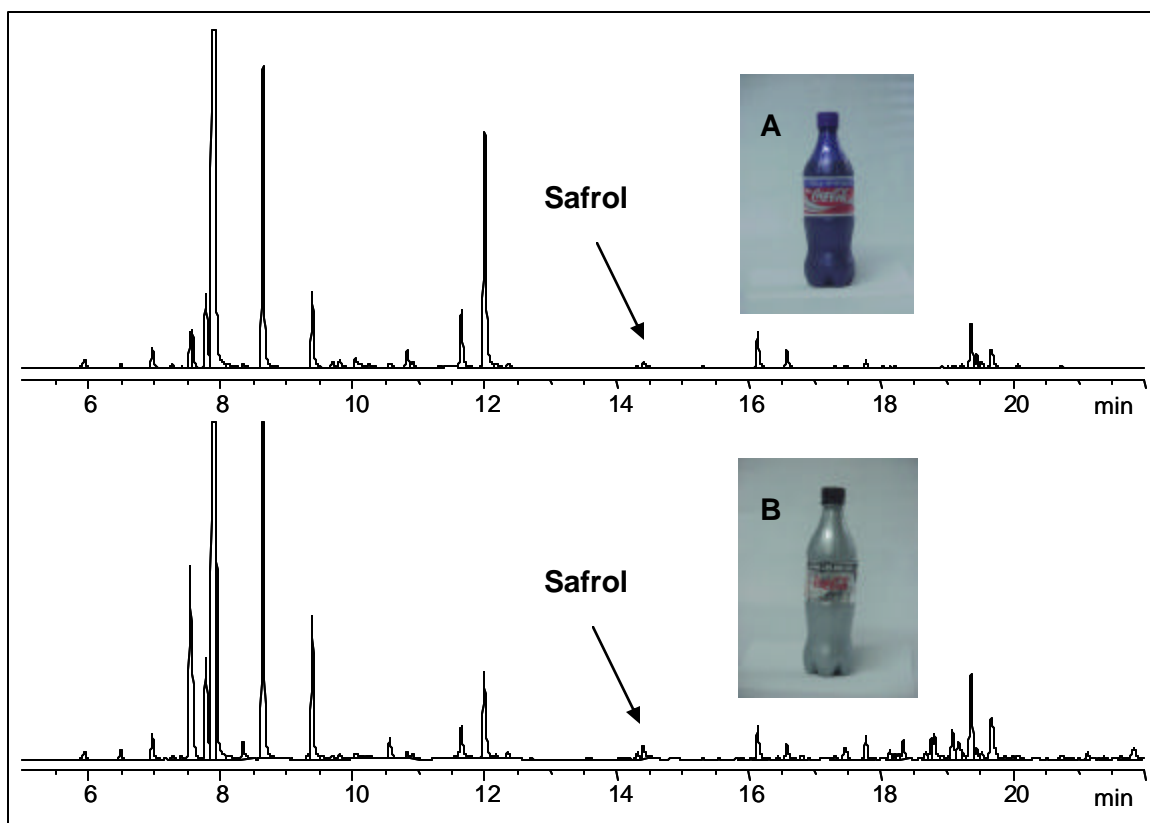
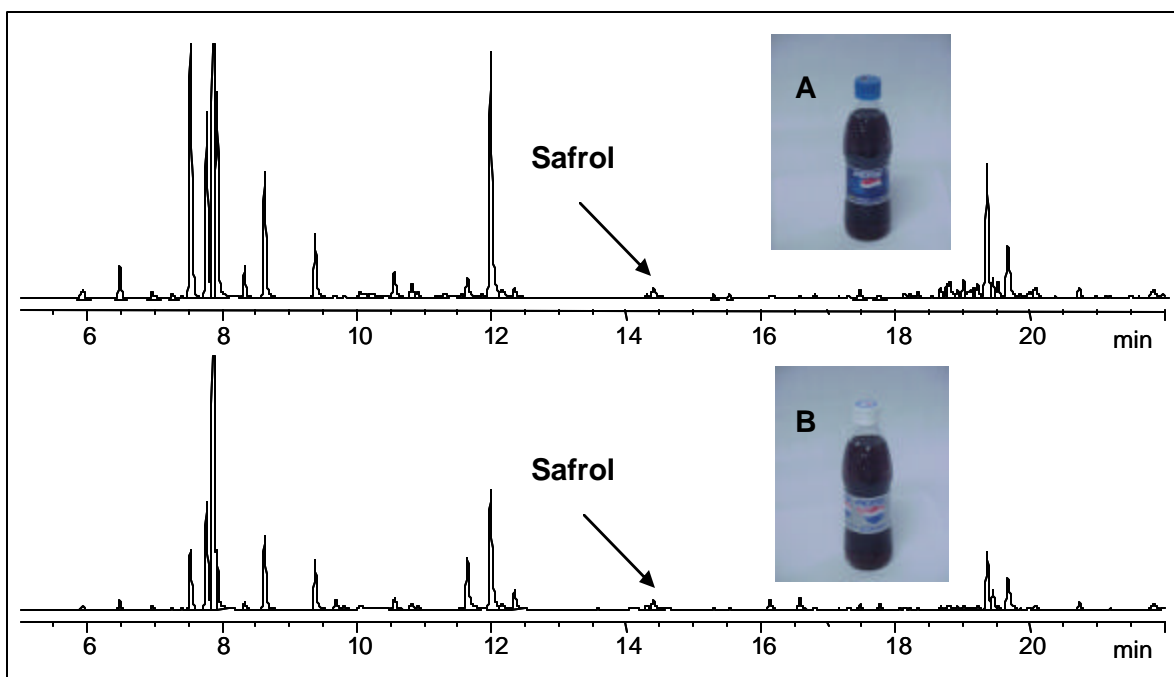


Figura 20. Perfiles cromatográficos, obtenidos por HRGC/FID de: **A.** Pepsi tradicional y **B.** Pepsi *light*.



Como se aprecia en las **Figuras 19** y **20**, todas las bebidas analizadas tienen safrol, lo cual demuestra que este compuesto, proveniente de algunos aceites esenciales (canela y nuez moscada), hace parte de la formulación del sabor Cola.

Al comparar los perfiles cromatográficos de los volátiles de la Coca-Cola y la Pepsi (tanto tradicional, como *light*), se observa una gran similitud en cuanto a la composición de sustancias aromatizantes en estas bebidas.

3.3.1 Cuantificación del safrol en bebidas tipo Cola. Los resultados obtenidos para la cuantificación del safrol por el método de adición de estándar en las muestras analizadas (Descrito en la **Sección 2.5** de la Parte Experimental), se muestran a

continuación en la **Tabla 20**. Las fórmulas utilizadas en la cuantificación aparecen en la **Sección 2.5.1**.

Tabla 20. Determinación del safrol en bebidas tipo Cola.

Muestra	Concentración, ppb	Cantidad de safrol, ng ($X^1 \pm t S_x$)²
Coca-Cola tradicional	25.4	250 ± 4 E1
Coca-Cola tradicional	35.3	350 ± 4 E1
Pepsi tradicional	38.3	380 ± 4 E1
Coca-Cola <i>light</i>	51.9	520 ± 4 E1
Pepsi <i>light</i>	36.1	360 ± 4 E1

¹ X: promedio, en un volumen de 10 mL, n=2

² Ver **Sección 2.5.1**

☞ **Extracción exhaustiva del safrol de bebidas tipo Cola, por HS-SPME.** En la **Tabla 21** se presentan los resultados obtenidos para la extracción exhaustiva, donde se muestra la cantidad de safrol extraída en cada una de las extracciones. La curva de calibración empleada para la cuantificación aparece en el **Anexo 3** La extracción exhaustiva por HS-SPME permitió determinar la cantidad total de safrol de 348.6 ng en la bebida Coca-Cola analizada.

Tabla 21. Extracción exhaustiva del safrol por HS-SPME.

Extracción	Área, cuentas	Cantidad de safrol extraída	
		µmol	ng
1	2739.44	4.56 E-4	73.96
2	1843.64	3.07 E-4	49.78
3	1815.82	3.03 E-4	49.03
4	1410.24	2.35 E-4	38.08
5	1059.82	1.77 E-4	28.62
6	1020.77	1.70 E-4	27.56
7	816.260	1.36 E-4	22.04
8	614.879	1.02 E-4	16.60
9	574.228	9.57 E-5	15.50
10	566.358	9.44 E-5	15.29
11	451.133	7.52 E-5	12.18
Total		2.15 E-3	348.6

Con base en los resultados obtenidos en la cuantificación al tomar 1 L de Coca-Cola cada día, ingresa al organismo 25.4 µg de safrol/día, 178 µg/semana y 9.3 mg/año. Por último, una persona de 60 años que consuma esta bebida desde los 10 años, diariamente, ingiere durante estos años 465 mg de safrol.

3.4 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS REPORTADOS EN LA LITERATURA CON EL MÉTODO DESARROLLADO POR HS-SPME, PARA LA DETERMINACIÓN DE SAFROL EN BEBIDAS TIPO COLA.

En la **Tabla 22** se resumen las figuras analíticas de mérito para cada uno de los métodos reportados en la literatura y para el método desarrollado HS-SPME en la presente investigación, para la determinación de safrol en bebidas tipo Cola.

Tabla 22. Figuras analíticas de mérito para los métodos reportados en la literatura y del método desarrollado, para el análisis del safrol en bebidas tipo Cola.

Método	Recuperación, %	CV, %	LOD	Linealidad	Tiempo de preparación de la muestra	Volumen de muestra, mL	Observaciones
Directo [27]	105-108	5.4-8.7	0.25 ppm	R ² =0.98 0.1-5.0 ppm	25 min	1	
Método 969.13, AOAC [28]				7.9-1000 ppm	2 h	200	Uso de cloroformo (tóxico)
Hidrodestilación [29]	80-93	2.7-5.1	10 ppm	R ² =0.9985	2 h	500	No se detectó safrol por encima del LOD
SDE [30]	94-105	N.R.	5 ppm	R ² = 0.996 0.5-25 ppm	1.5 h	200	Uso de diclorometano No detectó safrol por encima del LOD
HS-SPME	94	4.3	7.8 ppb	R ² = 0.9991 15.6-1000 ppb	30 min	2	No uso de solventes Se cuantificó safrol en todas las muestras analizadas

N.R. - No reportado

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente citados en la **Tabla 21**, se concluyen las siguientes ventajas del método desarrollado en el presente trabajo:

- ∅ El método desarrollado por HS-SPME no requiere el uso de solventes, lo cual reduce su costo y lo hace compatible con el medio ambiente, mientras que el método AOAC emplea cloroformo y SDE, diclorometano, los cuales son solventes altamente tóxicos y aumentan el costo de análisis por muestra. Además, el método por SPME combina la extracción y la concentración de los analitos en un solo paso, reduciendo aún más el tiempo de análisis, el cual es de tan solo 30 min., frente a 2 h mínimas para la preparación de la muestra usando los otros métodos reportados en la literatura.

- ∅ El método de adición de estándar tiene en cuenta la complejidad de la matriz y permite la cuantificación del compuesto de interés aún cuando no se dispone de un blanco de la matriz. Tal es el caso de las gaseosas, en especial, de las bebidas Cola, donde el reemplazo de la bebida variaría el tipo y el número total de compuestos presentes en la muestra. Por medio de esta técnica de cuantificación se alcanzó una linealidad mucho mayor ($R^2= 0.9991$), que la reportada por los otros métodos; dentro de un rango de concentración de tres niveles de magnitud.

- ∅ El LOD, por el método desarrollado por HS-SPME, fue mucho más bajo (del orden de ppb), que el de los otros métodos (del orden de ppm), lo cual permitió determinar el safrol en las bebidas tipo Cola analizadas, ya que en estas bebidas es necesario alcanzar este nivel de concentración. Además, la eficiencia de extracción alta obtenida (94 %), dentro de los límites permisibles, con una buena precisión (CV= 4.3 %), demuestra la exactitud del método; esta recuperación es mayor a la conseguida por el método de hidroddestilación, sin presentar el efecto de memoria mostrado en los métodos directo y SDE, donde el porcentaje de recuperación fue mayor del 100 %.

4. CONCLUSIONES

- ∅ Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de safrol por cromatografía de gases de alta resolución con detectores de ionización en llama y selectivo de masas en bebidas carbonatadas no alcohólicas tipo Cola, empleando microextracción en fase sólida en el modo *headspace*. Para el desarrollo y la validación del método se optimizaron las condiciones de extracción, se determinaron las figuras analíticas de mérito, se cuantificó el safrol en bebidas tipo Cola, Coca-Cola y Pepsi-Cola, y se comparó el método desarrollado con los reportados en la literatura.

- ∅ Se determinaron las condiciones de extracción más favorables para el análisis de safrol en bebidas tipo Cola por HS-SPME, mediante un diseño experimental de *screening* y un diseño de superficie de respuesta. Las condiciones encontradas fueron: fibra de PDMS-100 μm , temperatura de 48 °C y tiempo de exposición de la fibra de 30 min.

- ∅ Las figuras analíticas de mérito determinadas, permitieron demostrar la idoneidad del método desarrollado para la determinación del safrol en bebidas tipo Cola, por HS-SPME. Los resultados obtenidos fueron:
 - ✓ Precisión, estimada como repetibilidad: 0.04 % (para t_R) y 9.3 % (para áreas), valores inferiores a los máximos permisibles (2 y 10 %), según GLP.
 - ✓ Exactitud, reportada como recuperación: 94 ± 4.0 %, valor comprendido dentro del rango aceptado (70-120 %), según la literatura.
 - ✓ Linealidad y sensibilidad: $R^2 = 0.9991$, pendiente: $12.421 \pm 3 \text{ E-1}$, para un rango de concentración de 15.6 -1000 ppb (156 – 10000 ng).
 - ✓ LOD y LOQ: 7.8 ppb (78 ng) y 15.6 ppb (156 ng), respectivamente, más bajos que para la mayoría de los métodos tradicionales.

- ✓ Especificidad y selectividad: se comprobó la homogeneidad o pureza del pico cromatográfico por GC/MS, según lo recomendado por los protocolos de validación de métodos.

✂ Se cuantificó safrol en bebidas tipo Cola por el método de adición de estándar, empleando la metodología propuesta en el presente trabajo. Los resultados obtenidos en cada una de las presentaciones analizadas fueron: Coca-Cola tradicionales: 25.4 ppb (254.4 ng) y 35.3 ppb (353.3 ng), Pepsi-Cola tradicional: 38.3 ppb (382.9 ng), Coca-Cola *light*: 51.9 ppb (519.4 ng) y Pepsi-Cola *light*: 36.1 ppb (360.9 ng). Todas las determinaciones con un límite de confianza típico de ± 4 E1. La extracción exhaustiva permitió determinar una cantidad de safrol de 348.6 ng en la bebida Coca-Cola analizada.

✂ El método desarrollado por HS-SPME para la determinación del safrol en bebidas tipo Cola demostró superar muchas de las limitaciones inherentes a cada uno de los métodos convencionales reportados para este análisis; ya que, contrario a los otros métodos, éste no requiere solvente y, por ende, la manipulación de la muestra es mínima, es mucho más rápido, preciso, su costo por muestra es inferior y, además, alcanza la sensibilidad requerida para este tipo de análisis, permitiendo de esta manera una cuantificación fiable al nivel de concentración requerido (del orden de ppb).

5. RECOMENDACIONES

- ∅ Dada la idoneidad del método desarrollado para la determinación de safrol en bebidas tipo Cola por HS-SPME, se recomienda esta técnica a las empresas que comercializan bebidas tipo Cola como herramienta de control del safrol.

- ∅ Teniendo en cuenta los excelentes resultados logrados utilizando HS-SPME para la determinación de safrol en bebidas tipo Cola, esta técnica debería considerarse como alternativa a los métodos convencionales de análisis de bebidas (los cuales con frecuencia son dispendiosos, contaminantes y requieren una inversión enorme de tiempo y costo por análisis), para la determinación de otras sustancias saborizantes, posiblemente tóxicas en esta matriz o incluso, podría extenderse su uso a otros tipos de bebidas carbonatadas.

- ∅ Es importante que las autoridades competentes realicen un control estricto en cuanto a toxicidad y salubridad de las CSD's, ya que este grupo de alimentos es de amplio consumo en la actualidad. Es responsabilidad de las empresas que las comercializan, garantizar la inocuidad de su producto o como en el caso presentado en esta investigación, donde a pesar de estar el safrol en un nivel permitido, este compuesto tiene un efecto acumulativo en el ADN; el consumidor debe ser advertido ante un peligro potencial para su salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SECRETARÍA REGIONAL LATINOAMERICANA. *Ranking* de consumo de refrescos [en línea]. Montevideo. UITA [citado en 2005-06-29]. Disponible en Internet: http://www.rel_uita.org/old/sectores/bebidas/noticias_bebidas.html.
2. BEVERAGE MARKETING CORPORATION. Soft drink markets in 174 countries worldwide documented in massive five-volume [online]. [cited 2005-06-29]. Available from internet: <http://www.beveragemarketing.com/news2p.htm>.
3. SERVICIO NACIONAL DEL CONSUMIDOR. Bebidas cola: análisis de cafeína, azúcar y edulcorante [en línea]. Santiago de Chile. Sernac [citado en 2005-06-29]. Disponible en Internet: <http://www.sernac.cl/estudios/productos.asp?cod=1246&CodArea=13>.
4. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Safrole, isosafrole and dihidrosafrole. En : IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some naturally occurring substances. Vol. 10 (1976); p. 231-244.
5. WEISBURGER, John. Chemical carcinogenesis. En : CASARETT, Louis and DOULL, John. Toxicology : the basic science of poisons. New York : Macmillan Publishing, 1975. p. 333-339.
6. UENG, Yune-Fang ; HSIEH, Chih-Hang and DON, Ming-Jaw *et al.* Identification of the main human cytochrome P450 enzymes involved in safrole 1'-hydroxylation. En : Chem. Res. Toxicol. Vol. 17, (2004); p. 1151-1156.
7. JEURISSEN, Suzanne; BOGAARDS, Jan and AWAD, Hanem *et al.* Human cytochrome P450 enzyme specificity for bioactivation of safrole to the proximate carcinogen 1'-hydroxysafrole, En : Chem. Res. Toxicol. Vol. 17, (2004); p. 1245-1250.

8. LEE, Jang-Ming; LIU, Tsung-Yung and WU, Deng-Chyang *et al.* Safrole-DNA adducts in tissues from esophageal cancer patients : clues to areca – related esophageal carcinogenesis. En : *Mutat. Res.* Vol. 565, (2005); p. 121-128.
9. CHEN, Chiu-Lan ; CHI, Chin-Wen and CHANG, Kuo-Wei *et al.* Safrole-like DNA adducts in oral tissue from oral cancer patients with a betel quid chewing history. En : *Carcinogenesis.* Vol. 20, No. 12 (1999); p. 2331-2334.
10. LIU, Chung-Ji ; CHEN, Chiu-Lan and CHANG, Kuo-Wei *et al.* Safrole in betel quid may be a risk factor for hepatocellular carcinoma : case report. En : *Canadian Medical Association or its Licensors.* Vol. 162, No. 3 (2000); p. 359-360.
11. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion of the Scientific Committee on food on the safety of the presence of safrole (1-allyl-3,4-methylene dioxy benzene) in flavourings and other food ingredients with flavouring properties. En : *European Commission : Health & Consumer Protection directorate-general.* (jan., 2002); 13 p.
12. WOODROOF, Jasper and PHILLIPS, Frank. *Beverages: Carbonated and Noncarbonated.* Westport : The Avi Publishing, 1974. p. 1-25, 352 - 366.
13. POTTER, Norman and HOTCHKISS, Joseph. *Food Science.* 5 *ed.* New York : Chapman & Hall, 1995. p. 437-442.
14. MERORY, Joseph. *Food flavorings : composition manufacture and use.* 2 *ed.* Westport : The Avi Publishing, 1968. 478 p.
15. GOODMAN, Alfred *et al.* *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 8 *ed.* México : Médica Panamericana, 1991. p. 606 – 615.
16. TISSERAND, Robert and BALACS, Tony. *Essencial oil safety.* London : Churchill Livingstone, 1995. p . 38, 54, 168-169, 181, 188.

17. HELFERICH, William and WINTER, Carl. Food Toxicology. Boca Ratón : CRC Press LLC, 2001. p. 142-143.
18. CARCINOGENICITY: SAFROLE: First listed in the second annual report on carcinogens. En : Tenth report on carcinogens (1981); 3 p.
19. DEPARTMENT OF JUSTICE, Drug Enforcement Administration. En : Federal Register. Vol. 63, No. 179 (1998); p. 49506-49517.
20. MUNERATO, Maria; SINIGAGLIA, Marialva and REGULY, Maria *et al.* Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. En : Mutat. Res. Vol. 582, (2005); p. 87 – 94.
21. UENG, Yune-Fang; HSIEH, Chih-Hang and DON, Ming-Jaw. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by the natural hepatotoxin safrole. En : Food Chem. Toxicol. Vol. 43, (2005); p. 707-712.
22. PITOT, Henry and DRAGAN, Yvonne. Chemical carcinogenesis. En : KLAASSEN, Curtis. Toxicology : the basic science of poisons. 6 ed. New York : McGraw-Hill, medical publishing division, 2001. p. 250-254.
23. PARKINSON, Andrew. Biotransformation of xenobiotics. En : KLAASSEN, Curtis. Toxicology : the basic science of poisons. 6 ed. New York : McGraw-Hill, medical publishing division, 2001. p. 203-206.
24. BOLTON, Judy; ACAY, Nick and VUKOMANOVIC, Vesna. Evidence that 4-allyl-o-quinones spontaneously rearrange to their more electrophilic quinone methides : potential bioactivation mechanism for the hepatocarcinogen safrole. En : Chem. Res. Toxicol. Vol. 7, (1994); p. 443-450.
25. BENEDETTI, Strolin; MALNOË, A. and BROILLET, Louis. Absorption, metabolism and excretion of safrole in the rat and the man. En : Toxicology. Vol. 7 (1977); p. 69-83.

26. RANDERATH, K.; PUTMAN, K.L. and RANDERATH, E. Flavor constituents in Cola drinks induce hepatic DNA adducts in adult and fetal mice. En : Biochem. and Biophys. Res. Commun. Vol. 192, (1993); p. 61-68.
27. CHOONG, Younk-Meng and LIN, Hsiu-Jung. A rapid and simple gas chromatographic method for direct determination of safrole in soft drinks. En : J. Food and Drug Analysis. Vol. 9, No. 1(2001); p. 27-32.
28. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS : Food composition, additives, natural contaminants. 15 ed. Arlington : Kenketh Helrich, 1990. v.2, p. 754-755. (AOAC 969.13).
29. BONINI, Monica; FOSSATI, Alessandro and LUBIAN, Elisabetta *et al.* GC/MS/MID Determination of safrole in soft drinks. En : Mitt. Lebensm. Vol. 93, (2002); p. 194-198.
30. SIANO F.; GHIZZONI, C. and GIONFRIDDO, F. *et al.* Determination of estragole, safrole and eugenol methyl eter in food products. En : J. Food Chem. Vol. 81, No. 3 (jun., 2003); p. 469-475.
31. HOFFMANN, Andreas; HEIDEN, Arnd and PFANNKOCH, Edward. Flavor profiling of beverages by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS/PFPD. Application note 04. En : GERSTEL: global analytical solutions. (2000); p. 1-3, 7.
32. BROWN, Helen; WILLIAMS, James and WILLIAMS, Barrie. Development and validation of a solid-phase microextraction method for the determination of coumarin and safrole in foods: project A01008. En : Research summary. 1998. p. 18-20.
33. ZENG, Eddy and NOBLET, James. Theoretical considerations on the use of solid-phase microextraction with complex environmental samples. En : Environ. Sci. Technol. Vol. 36, (2002); p. 3385-3392.

34. AI, Jiu. Solid-phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations. En : Anal. Chem. Vol. 69, (1997); p. 1230 – 1236.
35. SUPELCO. Solid-phase microextraction : theory and optimization of conditions. En : Supelco: Bulletin 923. (1998); 5 p.
36. PAWLISZYN, Janusz. Solid-phase microextraction : theory and practice. New York : Wiley-VCH, 1997. 247 p.
37. STEFFEN, Alexandra and PAWLISZYN, Janusz. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. En : J. Agric Food Chem. Vol. 44, (1996); p. 2187-2193.
38. PAWLISZYN, Janusz. Applications of solid-phase microextraction. New York : RSC Chromatography Monographs, 1999. 653 p.
39. SUPELCO. A practical guide to quantitation with solid-phase microextraction. En : Supelco: Bulletin 929. (1998); 8 p.
40. PAWLISZYN, Janusz. Theory of solid-phase microextraction. En : J. Chromatogr. Vol. 38, (jul. 2000); p. 270-277.
41. SHIREY, Robert. Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatile analytes using solid- phase microextraction. En : J. Chromatogr. Sci. Vol. 38, (jul., 2000); p. 279 – 288.
42. OTTO, Matthias. Chemometrics : Statistics and computer application in analytical chemistry. Weinheim : WILEY-VCH, 1999. 314 p.
43. BOX, George; HUNTER, William and HUNTER, Stuart. Estadística para investigadores : introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona : Reverté, 1993. p. 385-445.

44. SHARAF, Muhammad; ILLMAN, Deborah and KOWALSKI, Bruce. Chemometrics. New York : John Wiley & Sons, 1986. 332 p.
45. SWARTZ, Michael and KRULL, Ira. Analytical method development and validation. New York : MARCEL DEKKER, 1997. 92 p.
46. BURGESS, Christopher. Valid Analytical Methods & Procedures. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2000. 87 p.
47. MILLER, J.C. y MILLER, J.N. Estadística para química analítica. 2 ed. Delaware : Addison-Wesley Iberoamericana, 1993. p. 103-106.
48. SKOOG, Douglas; HOLLER, James and NIEMAN, Timothy. Principios de análisis instrumental. 5 ed. Aravaca : McGraw-Hill, 2001. p. 12-19.
49. LANCAS, Fernando. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. São Carlos : RiMa, 2004. 46 p.
50. ROOD, Dean. A practical guide to the care, maintenance and troubleshooting of capillary gas chromatographic systems. Heidelberg : Hüthing Buch Verlag, 1991. 312 p.
51. GARNER, W; BARGE, M. and USSURY, J. Good Laboratory Practice Standards. Washington D.C. : ACS Professional Reference Book, 1992. 321 p.
52. Guía de validación de métodos analíticos [en línea]. Disponible en internet: http://www.netsalud.sa.cr/ms/drc/pciudadano/guia_01.doc.

ANEXO 1

Áreas cromatográficas de la superficie de respuesta de la **Figura 15**.

Experimento	Niveles de las variables		Respuesta del detector, área-cuentas
	Temperatura, °C	Tiempo exposición de la fibra, min	
1	60	18	15149.1
2	60	18	13919.9
3	60	35	13005.2
4	40	30	18805.2
5	60	18	12454.3
6	88	18	7207.48
7	60	18	13978.0
8	40	6.0	7106.38
9	32	18	10729.3
10	80	30	11724.1
11	60	1.0	4658.07
12	60	18	12538.9
13	80	6.0	8029.59

ANEXO 2

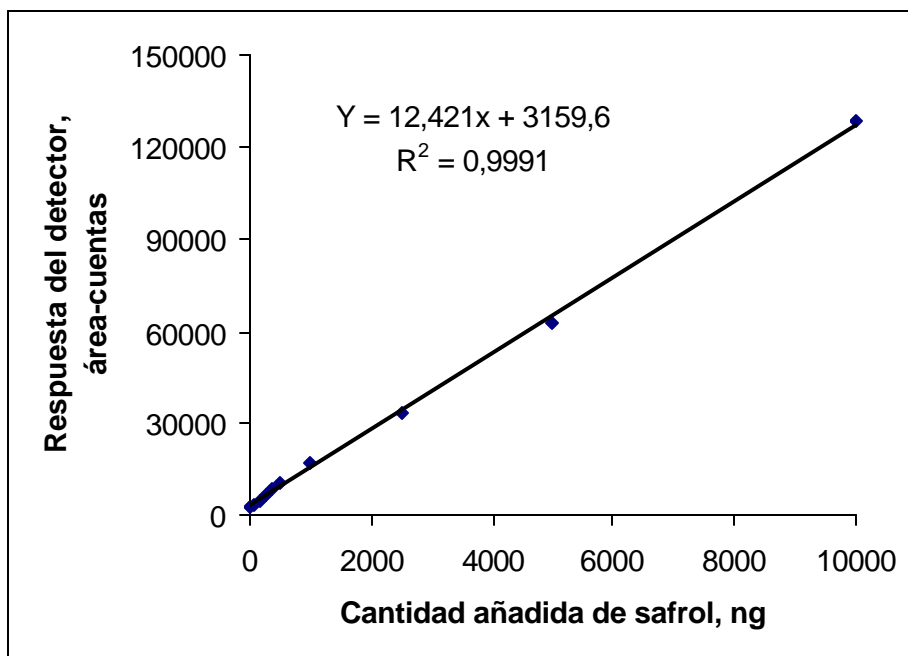
Áreas cromatográficas obtenidas para cada ensayo de eficiencia del método (**Sección 3.2.2**).

Cantidad añadida de safrol, ng	Respuesta del detector, área-cuentas	Cantidad de safrol obtenida experimentalmente después de la extracción, ng	Recuperación, %
300	6729.59	287.4	96
300	6721.82	286.8	96
300	6483.00	267.6	89

Donde la cantidad de safrol, obtenida experimentalmente después de la extracción se calculó con base en la ecuación de la curva de calibración: $Y=12.421x+3159.6$, siendo "Y" la respuesta del detector y "x" la cantidad de safrol calculada. El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo con la ecuación que aparece en la **Sección 2.4.2**.

ANEXO 3

Curva de calibración por el método de adición de estándar para el safrol, obtenida por HRGC/FID.



Curva de calibración del safrol obtenida por HRGC/FID, utilizada para la extracción exhaustiva.

