

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a red and white design, flanked by two golden lions. Above the shield is a golden crown. The shield is set against a light blue background. Below the shield are two green hills. The entire emblem is enclosed in a circular border with the Latin text "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERAS OBES CONSPICUA CAROLINA" around the top and "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERAS OBES CONSPICUA CAROLINA" around the bottom.

“Validación de la metodología de identificación y cuantificación de Colorantes Artificiales (Rojo Allura FD& C rojo No. 40 (16,035) y Amarillo Ocaso FD&C amarillo No.6 (15,985)) en mermeladas de fresa en presentación de tarro de vidrio 290g distribuidas en la Ciudad Capital de Guatemala”

Sindy Alejandra Palacios Castillo

Química Farmacéutica

Guatemala, noviembre de 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Validación de la metodología de identificación y cuantificación de Colorantes Artificiales (Rojo Allura FD& C rojo No. 40 (16,035) y Amarillo Ocaso FD&C amarillo No.6 (15,985)) en mermeladas de fresa en presentación de tarro de vidrio 290g distribuidas en la Ciudad Capital de Guatemala”

Informe de Tesis

Presentado por

Sindy Alejandra Palacios Castillo

Para optar el título de

Química Farmacéutica

Guatemala, noviembre de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

DEDICATORIA

- A DIOS:** Por ser mi inspiración, por brindarme de su amor y sabiduría, por darme las fuerzas para seguir adelante y nunca dejarme desamparada. Porque cuando estaba a punto de caer, siempre me recordaste tu palabra y tus promesas.
- A MIS PADRES:** Jaime Palacios y Verónica Castillo. Por ser mis dos luceros y mis motores para cumplir mis sueños. Les agradezco todo su apoyo y su amor incondicional, sin ustedes esta meta no podría ser posible. Ustedes son mis dos ejemplos a seguir. Los amo.
- A MIS HERMANOS:** Jaime Palacios y Paula Palacios. Por ser mis dos razones para seguir adelante y darles un buen ejemplo. Por su apoyo, pero sobre todo por ser mi fuente de alegría, por sus risas y su amor.
- A MI FAMILIA:** A mi abuela, abuelo, tías, tíos, primas y primos. Gracias por su cariño, por estar pendientes de mi progreso y por sus palabras de ánimo.
- A MIS AMIGOS:** A quienes conocí durante la universidad y me han acompañado en toda esta trayectoria. Muchas gracias por todos esos momentos especiales, risas, aventuras y por las palabras de ánimo. A mis amigas, que a pesar de no estar en la misma carrera siempre han estado pendientes de mí, les agradezco su cariño, apoyo y por estar siempre cuando las he necesitado. A todos aquellos que he conocido a lo largo de mi vida y que han sido de motivación y apoyo para culminar esta etapa. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

- A:** La Universidad de San Carlos y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Por ser mi casa de estudios y por brindarme los conocimientos necesarios para formarme profesionalmente.
- A:** Licenciada Julia Amparo García Bolaños, por ser mi asesora y mi compañera durante la realización de este trabajo. Gracias por todo su apoyo, cariño y tiempo dedicado.
- A:** Licenciada Aylin Santizo Juárez, por ser mi revisora y por brindarme sus conocimientos para que este trabajo fuera un éxito. Gracias por sus observaciones y su tiempo dedicado.
- A:** Doctora Sully Margot Cruz, por su apoyo al brindarme amablemente los materiales que necesitaba en su momento.
- A:** Mis catedráticos, por brindarme sus conocimientos durante toda mi etapa universitaria y por ayudarme a desarrollarme y desenvolverme en diferentes áreas académicas.
- A:** Todas las personas que de alguna u otra forma fueron parte de este proceso, muchas gracias.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. OBJETIVOS	36
6. HIPÓTESIS	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS	38
8. RESULTADOS	46
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
10. CONCLUSIONES	64
11. RECOMENDACIONES	65
12. REFERENCIAS	66
13. ANEXOS	68

1. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar los colorantes artificiales indicados en la etiqueta de las mermeladas de fresa y verificar su cumplimiento con los límites establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano -Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios- RTCA 67.04.54:10.

Con el fin de tener resultados certeros y al mismo tiempo tener un método que se pueda seguir utilizando en investigaciones futuras, se realizó la validación de la metodología de identificación y cuantificación de colorantes. Por lo tanto, el proceso se dividió en tres etapas; validación incluyendo la verificación del porcentaje de recobro utilizando lana de oveja, identificación y cuantificación de los colorantes presentes en las muestras de mermeladas.

Para la primera etapa de validación se llevaron a cabo pruebas para determinar los parámetros de linealidad, exactitud, precisión y robustez, tomando como referencia a lo establecido en la *“Política de Selección y Validación de Métodos de ensayo”* emitido por la Organización de Acreditación de Guatemala (OGA). Se llevaron a cabo diferentes curvas de calibración para cada colorante, en donde se pudo observar coeficientes de determinación no inferiores a 0.9998. Se llevó a cabo la verificación del porcentaje de recobro del colorante a través de la lana, en donde se observaron que los porcentajes de recobro se mantuvieron altos, con un promedio no menor al 98.0%. Así como también se observaron coeficientes de variación menores al 3% siendo un porcentaje aceptable. Asimismo, se obtuvieron resultados de robustez satisfactorios tras analizar cambios de pH y longitudes de onda.

En la segunda etapa se realizaron pruebas con diferentes fases móviles, con el fin de determinar una fase móvil que lograra arrastrar adecuadamente a los estándares y muestras en la sílica gel y así se lograra identificar adecuadamente la presencia o ausencia de los colorantes. Luego de someter a identificación a las tres marcas de mermeladas se observó que efectivamente una marca no presentaba colorante como lo indicaba su etiqueta y las otras dos marcas si presentaron los colorantes reportados.

En la tercera etapa se prosiguió a cuantificar los colorantes reportados en las otras dos marcas de mermeladas. Se tomaron lectura de sus absorbancias a las longitudes de onda máxima determinadas utilizando el espectrofotómetro UV-Visible. Y tras realizar los cálculos correspondientes se observó que todas las muestras de mermeladas cumplieron con los límites establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano -Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios- RTCA 67.04.54:10.

2. INTRODUCCIÓN

“La elaboración de mermeladas sigue siendo uno de los métodos más populares para la conservación de las frutas en general. Una verdadera mermelada debe presentar un color brillante y atractivo, reflejando el color propio de la fruta.” (Grupo Latino Editores, 2008)

Es por ello que en su elaboración se incorpora el uso de colorantes artificiales. Sin embargo, la seguridad de los colorantes artificiales certificados ha recibido una gran atención pública en los últimos años. Debido a su asociación con hiperactividad en niños y reacciones alérgicas como urticaria y asma, especialmente cuando se mezcla con otro color sintético en productos alimenticios. (Rovina, Siddiquee, & Shaarani, 2016)

Debido a esto se puede observar que en el Reglamento Técnico Centroamericano. –Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos alimentarios- (RTCA 67.04.54:10) se han establecido límites para cada uno de los colorantes, según el alimento al que se le desea añadir. En este caso, existen límites para Rojo Allura y Amarillo Ocaso en mermeladas, siendo estos 500mg/kg y 300mg/kg respectivamente. Siendo importante también, que el alimento cumpla con lo que aparece en la etiqueta y que la misma incluya la lista de ingredientes completa, para evitar que las personas consuman alimentos que contienen componentes a los que puede ser alérgico. Por otro lado, existe poco control de los alimentos después de que estos son sacados al mercado. No hay monitoreo que verifique que el alimento realmente sigue cumpliendo con lo establecido en la etiqueta estando ya disponible para el consumidor.

Para verificar que se esté cumpliendo con los límites establecidos, existe un método que se basa en la extracción del colorante alimenticio a través de lana de oveja junto a reactivos ácidos-básicos, su identificación basándose en cromatografía en capa fina y su cuantificación utilizando espectrofotometría UV-Visible. Sin embargo, es un método que no está validado. “Siendo el objetivo principal de la validación analítica el de asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto”. (CDER, 2016)

Es por ello que se llevó a cabo la validación de la metodología y su respectiva aplicación en la identificación y cuantificación de Rojo Allura y Amarillo Ocaso en mermeladas de fresa.

3. ANTECEDENTES

3.1 Mermeladas

“Se define a la mermelada de frutas como un producto de consistencia pastosa o gelatinosa, obtenida por cocción y concentración de frutas sanas, adecuadamente preparadas, con adición de edulcorantes, con o sin adición de agua. La fruta puede ir entera, en trozos, tiras o partículas finas y deben estar dispersas uniformemente en todo el producto.” (Grupo Latino Editores, 2008)

Según el Reglamento Técnico Centroamericano. Aditivos Alimentarios. RTCA 67.04.54:10. La mermelada es una pasta de fruta espesa y para untar preparada con la fruta entera, la pulpa o el puré de fruta que se ha hervido con azúcar para espesarla, y a la que puede añadirse pectina y trozos de fruta y trozos de piel de fruta.

Según el Codex Alimentarius, es el producto preparado con fruta entera, pulpa, puré, zumo (jugo), extracto acuoso o cáscara de frutos cítricos, mezclados con azúcares y/o edulcorantes carbohidratos como la miel, con o sin la adición de agua, y elaborado hasta adquirir una consistencia gelatinosa adecuada. Contiene trozos de cáscara de frutos cítricos (la cáscara de frutos cítricos es siempre un ingrediente clave en el producto final, sin importar la fase de la producción en la que ésta se añade).

“La elaboración de mermeladas sigue siendo uno de los métodos más populares para la conservación de las frutas en general. Una verdadera mermelada debe presentar un color brillante y atractivo, reflejando el color propio de la fruta. Además debe aparecer bien gelificada sin demasiada rigidez, de forma tal que pueda extenderse perfectamente. Debe tener por supuesto un buen sabor afrutado. También debe conservarse bien cuando se almacena en un lugar fresco, preferentemente oscuro y seco.” (Grupo Latino Editores, 2008)

La mermelada de fruta es un producto pastoso obtenido por la cocción y la concentración de una o más frutas adecuadamente preparadas con edulcorantes, sustancias gelificantes y acidificantes naturales, hasta obtener una consistencia característica.

La preparación de mermeladas ha pasado de ser un proceso casero, para convertirse en una importante actividad de la industria de procesamiento de frutas. La conservación de este producto

se basa en las características de las materias primas que se emplean y los varios efectos que se ejercen sobre los microorganismos potencialmente deteriorantes de las mermeladas.

En primer lugar la materia prima empleada son las frutas, y éstas en su mayoría se caracterizan por ser ácidas con un valor de pH que oscila entre 2.8 a 3.8, propiedad que limita el desarrollo de microorganismos patógenos, siendo las mermeladas atacables por hongos y levaduras.

En segundo lugar, el tratamiento de concentración se hace a temperaturas que pueden variar entre 85 y 96°C durante períodos de 15 a 30 minutos cuando menos. Este tratamiento térmico elimina de manera importante formas vegetativas de microorganismos y la mayoría de esporuladas.

Un tercer efecto conservante es la alta concentración de sólidos solubles que alcanza el producto final. La alta presión osmótica que presenta un producto con 65 a 68% de sólidos solubles impide el desarrollo de microorganismos. (Grupo Latino Editores, 2008)

3.1.1 Ingredientes

Los ingredientes que se incluyen comúnmente en la elaboración de mermeladas son frutas, agentes edulcorantes, gelificantes, acidificantes y otros aditivos que permita la legislación en cuanto a calidad y cantidad. (Grupo Latino Editores, 2008)

3.1.2 Las frutas

Lo primero a considerar es la fruta, que será tan fresca como sea posible. Con frecuencia se utiliza una mezcla de fruta madura con fruta que recién ha iniciado su maduración y los resultados son bastante satisfactorios. La fruta demasiado madura no resulta apropiada para preparar mermeladas, ya que no gelificará bien. La calidad final de la mermelada va a depender necesariamente de las características de sanidad, madurez y composición de las frutas que se empleen.

3.1.3 Azúcares

“El azúcar es un ingrediente esencial. Desempeña un papel vital en la gelificación de la mermelada al combinarse con la pectina. Los azúcares o edulcorantes más comúnmente usados en la elaboración de este tipo de conservas son la sacarosa, glucosa, jarabe invertido y las mieles. El contenido en azúcar de una conserva está expresado en porcentaje de sólidos solubles o grados Brix (°Bx). Estos se determinan directamente mediante lectura en refractómetro a 20°C y se expresan en porcentaje de sacarosa.” (Grupo Latino Editores, 2008)

3.1.4 Ácido cítrico

El ácido cítrico es importante no solamente para la gelificación de la mermelada sino también para conferir brillo al color de la mermelada, mejora el sabor, ayuda a evitar la cristalización del azúcar y prolonga su tiempo de vida útil. El ácido cítrico se añade antes de cocer la fruta ya que ayuda a extraer la pectina. (Grupo Latino Editores, 2008)

3.1.5 Pectinas

Las pectinas son hidrocoloides que en solución acuosa presentan propiedades espesantes, estabilizantes y sobre todo gelificantes. Su uso está muy extendido en la industria transformadora de frutas debido a su propiedad funcional de gelificación en medio ácido azucarado. (Grupo Latino Editores, 2008)

Las manzanas, las ciruelas, las moras y las naranjas son ricas en pectinas. Las zarzamoras, las fresas, las frambuesas y las piñas contienen cantidades moderadas, mientras que los duraznos, las peras y las cerezas son muy bajas en pectinas naturales. (Kirk, Sawyer, & Egan, 2008)

3.1.6 El ácido

El fenómeno de la gelificación está estrechamente ligado a la acidez activa, expresada como pH. La exacta valoración del pH es extremadamente importante, ya que una mínima

diferencia en la zona del óptimo de gelificación influye definitivamente sobre la rigidez y consistencia de un gel.

El ácido debe ser introducido al final de la cocción ya que con esto se crean las condiciones necesarias para la gelificación y se inicia el proceso. Los ácidos más usados son el cítrico, el tartárico y menos comúnmente el láctico y el fosfórico. El ácido cítrico es considerado generalmente más propicio por su agradable sabor. (Grupo Latino Editores, 2008)

3.2 Elaboración industrial de mermeladas

Al procedimiento seguido en la preparación de mermeladas y al tipo de materias primas empleadas, se unen además ciertas condiciones fundamentales de carácter general, relacionadas con la formulación necesaria para que se logre obtener un producto que cumpla con las exigencias de calidad.

Las fórmulas de fabricación están constituidas por varios factores que contribuyen, en forma unida, a lograr las cualidades peculiares del producto terminado. Estos factores son:

- Sólidos solubles del producto terminado (expresados como °Brix).
- El óptimo de azúcar invertido.
- Acidez total y el pH del producto.

“Los otros factores como las características fisicoquímicas de la fruta, de la pectina y del agua, constituyen variables que provocan un continuo adaptamiento y ajuste de las fórmulas de elaboración, tarea a cargo del especialista experimentado en la preparación de este tipo de conservas.” (Grupo Latino Editores, 2008)

“En el hogar se parte de frutas frescas troceadas, sobre todo de las que tienen pectinas gelificantes como manzanas, cáscaras de cítricos y manzanillo, ya que en la fresa y la piña no están presentes. Las frutas, añadidas de azúcar y jugo de limón (ácido cítrico), se calientan a ebullición por horas para concentrar los sólidos y así se envasan.” (Badui, s.f)

En la gran industria se parte de frutas congeladas, se les añaden pectinas comerciales, azúcar o jarabe de fructosa y ácido cítrico; se cierra el evaporador y las bombas de vacío reducen la presión

a 460-480 mm Hg para vaporizar el agua a 65°C hasta alcanzar una concentración de 55 a 65 °Brix en un corto tiempo; en estas condiciones se destruyen microbios y enzimas, pero no se propicia tan intensamente la reacción de Maillard y el oscurecimiento del producto, y tampoco se pierden los sabores naturales de las frutas. La gelificación de las pectinas es la base de las mermeladas y por eso el azúcar y el ácido se deben añadir en las proporciones correctas; en exceso, la sacarosa cristaliza y causa mal aspecto, pero si son insuficientes las pectinas no gelifican.

Una vez alcanzada en el evaporador la concentración requerida en grados Brix, los envases de vidrio o de plástico se llenan con la mermelada caliente, prácticamente estéril en ese momento; el enfriamiento posterior del envase produce la condensación interna del vapor de agua y con ello un ligero vacío que hace cóncava su tapa. Sin embargo, una vez abierto puede contaminarse con hongos, como lo hacen otros alimentos de humedad intermedia, razón por la que se le añade benzoato de sodio en 100 partes por millón (ppm). (Badui, s.f)

“El principio básico en la fabricación de conservas y mermeladas es hervir en conjunto la fruta (preparada adecuadamente), azúcares (jarabe de sacarosa, jarabes de glucosa de alta conversión y en menor grado en la actualidad, jarabe de azúcar invertida) y agua. En el caso de la mermelada, las cáscaras se cuecen aparte antes de mezclarlas. Durante la ebullición, aumenta la proporción de la materia sólida en la mezcla (debido a la evaporación del agua), una porción de la sacarosa se hidroliza en azúcar invertida y se produce un gel al enfriarse. Cuando la fruta es baja en pectina o en ácido, la deficiencia se compensa agregando soluciones de dichos ingredientes al final de la ebullición.” (Kirk, Sawyer, & Egan, 2008)

Cuando el proceso se lleva a cabo en condiciones atmosféricas, el punto de ebullición se alcanza a cerca de 106°C, el azúcar tiende a caramelizar en forma excesiva y el sabor puede deteriorarse. Dicho deterioro de la calidad es menos probable que ocurra si la ebullición se efectúa al vacío (al bajar el punto de ebullición aproximadamente a 71°C). Sin embargo, el proceso al vacío es menos adecuado para efectuar la eliminación del dióxido de azufre de las pulpas sulfitadas. Las pulpas sulfitadas tienen su color natural fuertemente blanqueado por el SO₂, de modo que es necesario añadir colorantes para restablecer la apariencia.

El análisis de rutina de las conservas, jaleas y mermeladas debe incluir las determinaciones de los sólidos solubles, el dióxido de azufre y los metales traza, así como un examen del tipo de los colorantes adicionados y de la fruta presente. (Kirk, Sawyer, & Egan, 2008)

3.3 Aditivos

Legalmente se consideran como aditivos aquellas sustancias añadidas de manera intencional a los alimentos para mejorar sus propiedades físicas, sabor, conservación, etc., pero no aquellas añadidas con el objetivo de aumentar su valor nutritivo.

El uso correcto de aditivos permite:

- Conservar la calidad nutricional.
- Proporcionar ingredientes necesarios para grupos con necesidades dietéticas especiales.
- Aumentar la estabilidad o mejorar propiedades sensoriales, sin engañar.
- Ayudar en la fabricación, transporte o almacenamiento, sin encubrir defectos.

Para ello existen normas que regulan el uso de aditivos, colocando una lista de aditivos permitidos, y su cumplimiento es obligatorio. (Grupo Latino Editores, 2008)

Anteriormente Guatemala se basaba en la Norma GOGUANOR 34 192 “Aditivos alimentarios para consumo humano”. Sin embargo, esta norma ha dejado de estar vigente con la actualización de las Normas COGUANOR publicado en noviembre del 2016. Por lo tanto, a partir de tal fecha, para determinar los aditivos y sus cantidades permitidas en cada alimento se recurre al Reglamento Técnico Centroamericano. –Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos alimentarios- (RTCA 67.04.54:10), en el cual se indican los aditivos permitidos para las mermeladas junto con su nivel máximo permitido, como se puede observar en el Cuadro No. 1.

Cuadro No.1 Aditivos permitidos en mermeladas.

Categoría de Alimentos No 0.4.1.2.6	Confituras, jaleas, mermeladas
Aditivo	Nivel Máximo Aceptado
Acesulfame Potásico	1000 mg/kg
Adipatos	2000 mg/kg
Alginato de propilenglicol	5000 mg/kg

Alitame	100 mg/kg
Amarillo de Quinoleina	500 mg/kg
Amarillo Ocaso FCF	300mg/kg
Aspartame	1000 mg/kg
Azul Brillante FCF	500 mg/kg
Benzoatos	1000 mg/kg
Cantaxantina	200 mg/kg
Carmines	200 mg/kg
Carotenoides	500 mg/kg
Carotenos Vegetales	1000 mg/kg
Ciclamatos	1000 mg/kg
Color Caramelo, Clase III	BPM
Color Caramelo, Clase IV	1500 mg/kg
Dimetilpolisiloxano	30 mg/kg
EDTAs	130 mg/kg
Eritrosina	BPM
Esteres de Sorbitan de Acidos Grasos	5000 mg/kg
Extractos de Bija, Bixina, Norbixina, Annato	20 mg/kg
Glicosidos de esteviol	360 mg/kg
Indigotina	500 mg/kg
Marron HT	500 mg/kg
Neotamo	70 mg/kg
Óxidos de Hierro	200 mg/kg
Pectinas (Amida y no amida)	BPM
Ponceau 4R	100 mg/kg
Riboflavininas	200 mg/kg
Rojo Allura AC	500 mg/kg
Sacarina	200 mg/kg
Sales de Aspartamo y Acesulfamo	1000 mg/kg
Sorbatos	1000 mg/kg
Sucralosa	400 mg/kg
Sulfitos	100 mg/kg
Tartracina	500 mg/kg
Tartratos	BPM
Verde Sólido FCF	400 mg/kg

Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano. –Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos alimentarios- (RTCA 67.04.54:10)

3.4 Colorantes

Colorante es cualquier compuesto químico ya sea natural o sintético que tiene la propiedad de dar color. Si son de origen natural también se les denomina “pigmentos” y están presentes en las células y tejido animal y vegetal. A los sintéticos se les llama colorantes y lacas.

Cuando los alimentos se cocinan pierden su color natural, razón por la cual se puede mejorar su aspecto óptico con colorantes. Sólo unos pocos colorantes están permitidos para casi todos los alimentos, los demás se pueden utilizar sólo en determinados alimentos. Puede haber cierto riesgo con algunos colorantes para las personas alérgicas. (Grupo Latino Editores, 2008)

Estos compuestos confieren, acentúan o modifican el color de cereales, bebidas embotelladas, postres, sopas, yogures, quesos, cárnicos y muchos otros alimentos. (Badui, s.f)

Los colorantes naturales se dividen en tres categorías:

1. De origen vegetal, como la clorofila, los carotenoides, las antocianinas y las betalainas.
2. De origen animal, como la cochinilla.
3. De origen mineral, principalmente el dióxido de titanio de color blanco.

Por otra parte, los colorantes sintéticos o artificiales tienen mayor poder de tinción que los naturales y se pueden dividir en hidrosolubles, adecuados para alimentos con agua y en lacas para productos secos y con grasa. Su grupo cromóforo, responsable del color, tiene diferentes orígenes químicos. (Badui, s.f)

“Los colorantes artificiales son solubles en agua, debido a la presencia de grupos de ácido sulfónico, y consecuentemente son fáciles de utilizar, generalmente en forma de sales sódicas, en líquidos y materiales pastosos. Además de mucho más fáciles de utilizar que los colorantes naturales, los colorantes artificiales son también, en general, más resistentes a los tratamientos térmicos, pH extremos, luz, etc., que los colorantes naturales. Solamente la eritrosina, el índigo y el verde lisamina son relativamente sensibles a la acción de la luz.” (Calvo, 2004)

3.4.1 Aspectos Regulatorios

En Estados Unidos, el uso de colorantes está regulado por el suplemento “Color Additive Amendment” publicado en 1960 que completa el “Food, Drug and Cosmetic Act” de 1938 de la Food and Drug Administration (FDA). Este suplemento clasifica los colorantes en dos categorías colorantes certificados y colorantes exentos de certificación. Los colorantes certificados son compuestos sintéticos que no se encuentran en la naturaleza. El proceso de certificación conlleva que el colorante debe cumplir determinadas especificaciones de calidad establecidas por el gobierno. Se deben enviar muestras de cada lote de producción a los laboratorios de la FDA para que se confirme el cumplimiento de estas especificaciones. Si el lote cumple tales requisitos se le asigna un número de lote oficial. Además los colorantes certificados se clasifican a su vez en provisionales o permanentes. Un colorante certificado provisionalmente puede utilizarse legalmente a la espera de completar todas las investigaciones científicas necesarias para determinar si se incluye o no en la lista de colorantes certificados permanentemente. (Srinivasan, Kirk, & Owen, 2008)

El Color Additive Amendment incluye una nomenclatura simplificada de los colorantes certificados. En lugar de emplear nombres comunes largos y difíciles, a los colorantes certificados se les asigna un número junto a la abreviatura FD&C, D&C, o Ext. (externa) D&C. Los FD&C son colorantes que pueden utilizarse en alimentos, fármacos y cosméticos.

Cuadro No.2 Colorantes certificados

Nombre	Colorante	Nombre Común	Número E ^a
FD&C Blue No. 1	Permanente	Azul Brillante FCF	E 133
FD&C Blue No. 2	Permanente	Indigotina	E 132
FD&C Green No. 3	Permanente	Verde Sólido FCF	^c
FD&C Red No. 3	Permanente	Eritrosina	E 127
FD&C Red No. 40	Permanente	Rojo Allura	E 129
FD&C Yellow No. 5	Permanente	Tartrazina	E 102
FD&C Yellow No.6	Permanente	Amarillo Anaranjado S	E 110

a Números E: Números listados en la Comunidad Económica Europea.

c No listada.

Fuente: (Srinivasan, Kirk, & Owen, 2008)

3.4.2 Propiedades de los colorantes certificados

La seguridad de los colorantes certificados ha recibido una gran atención pública en los últimos años. El origen de esta preocupación puede atribuirse en parte a la desafortunada asociación entre los colorantes sintéticos con el término original de tintes “derivados de alquitranes”. La imagen que tiene el público del alquitrán es la de una sustancia negra espesa inadecuada para usarla en los alimentos. La realidad es que las materias primas utilizadas en la síntesis de colorantes son altamente purificadas antes de su empleo. El producto final es una especie química que guarda muy poca relación con el término alquitrán. (Srinivasan, Kirk, & Owen, 2008)

Los colorantes certificados caen en cuatro clases químicas básicas: los tipos azo, trifenilmetano, xantina e índigo.

3.4.3 Colorantes azoicos

Los colorantes azoicos deben su color a la presencia de un grupo azo conjugado con anillos aromáticos por ambos extremos. Como en el caso de los demás colorantes artificiales, los colorantes azoicos autorizados para su utilización como aditivos alimentarios son todos solubles en agua, debido a la presencia de grupos sulfónicos.

Los colorantes azoicos se han cuestionado reiteradamente, debido a que muchos colorantes de esta familia (no los autorizados para uso alimentario) han demostrado ser cancerígenos en experimentos con animales. Una diferencia fundamental es que los colorantes cancerígenos son poco polares, solubles en grasas, y atraviesan con cierta facilidad la barrera intestinal, incorporándose al organismo. En cambio, los colorantes autorizados, que son muy polares y solubles en agua, no se absorben. (Calvo, 2004)

Dentro de los colorantes a estudiar, pertenecen a este grupo los siguientes:

Amarillo anaranjado S

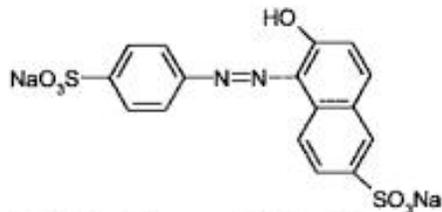
Rojo Allura AC

a) Amarillo anaranjado S

También conocido como “amarillo ocaso”, este colorante se utiliza en la mayor parte de los países del mundo, incluyendo Estados Unidos (con el código FD&C Yellow #6). Su fórmula empírica es $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$ con peso molecular de 452 gramos. Perteneciente a la clasificación monoazo que da una tonalidad amarillo rojiza. Soluble en agua y escasamente soluble en etanol.

La ingesta diaria aceptable de amarillo anaranjado S o amarillo No. 6 es de 3.75 mg/kg/día, o 112.5 mg para un niño de 30 kg. La producción promedio actual per cápita de amarillo No. 6 es equivalente a aproximadamente 14 mg/día, por lo que es el tercer colorante más utilizado. Considerando que las estimaciones de la FDA para "consumidor frecuente" promedio que consume alrededor de cinco veces más colorante que un “consumidor promedio” durante sus vidas, algunos niños pueden estar consumiendo cantidades superiores a la ingesta diaria admisible. (Kobylewski, 2010)

Imagen No.1: Molécula de Amarillo anaranjado S o Amarillo Ocaso



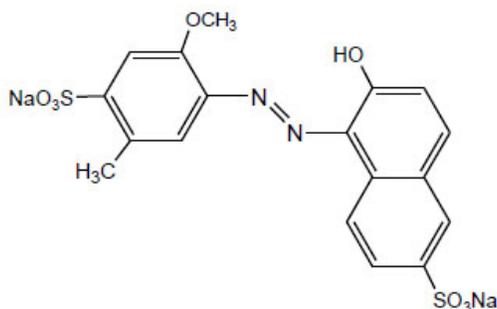
Fuente: (Kobylewski, 2010)

b) Rojo Allura

El colorante aniónico Rojo 40 es ampliamente utilizado en la industria textil, alimentaria y de tintas de tatuajes. Es un colorante ácido de la clase de los monoazos, también llamado Rojo allura, con fórmula química $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$; peso molecular de 496.42 gramos. Además, tiene propiedades ácidas y una estructura aromática constituida por tres anillos bencénicos. Se han establecido para este colorante características de toxicidad y patogenicidad en la mayoría de productos alimenticios en los cuales es adicionado, como bebidas gaseosas, productos lácteos y de repostería, de tal forma que su consumo no es recomendado para la población infantil en algunos países de Europa. (Kobylewski, 2010)

La ingesta diaria aceptable para el Rojo No. 40 o Rojo Allura es de 7 mg/kg/día. Lo que se traduce en 210 mg para un niño de 30kg.

Imagen No.2: Molécula de Rojo Allura



Fuente: (Kobylewski, 2010)

3.4.4 Valores Permitidos de Colorantes en Mermeladas

Según el Reglamento Técnico Centroamericano. –Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos alimentarios- (RTCA 67.04.54:10), estos son los valores máximos permitidos en el alimento en estudio; mermeladas, para cada uno de los colorantes artificiales.

Cuadro No.3 Límites máximos permitidos para el colorante artificial amarillo ocaso.

AMARILLO OCASO	
Categoría de alimentos	Nivel Máximo
Confituras, jaleas mermeladas	300mg/kg
Productos para untar a base de frutas	300mg/kg

Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54:10. Anexo de la resolución No. 283-2012 (COMIECO-LXII).

Cuadro No.4 Límites máximos permitidos para el colorante artificial Rojo Allura.

ROJO ALLURA	
Categoría de alimentos	Nivel Máximo
Confituras, jaleas mermeladas	500mg/kg
Productos para untar a base de fruta	500mg/kg

Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54:10. Anexo de la resolución No. 283-2012 (COMIECO-LXII).

3.5 Etiquetado de alimentos

Por etiquetado se entiende las menciones, indicaciones, marcas de fábrica o comerciales, dibujos o signos relacionados con el producto que figure en el envase, documento, rótulo, etiqueta, faja o collarín que acompañen o se refieran a dicho producto alimenticio. Todos los alimentos deben tener un nombre, que por sí solo los definan perfectamente. El etiquetado no debe inducir a error al consumidor sobre las características del producto, sobre su naturaleza, cantidad, composición, duración o identidad. (Grupo Latino Editores, 2008)

3.5.1 Información obligatoria del etiquetado

Como norma general requiere las siguientes indicaciones:

- Cantidad de ingredientes.
- Cantidad neta.
- Condiciones de conservación y utilización.
- Denominación de venta.
- Fecha de caducidad.
- Identificación de la empresa.
- Lista de ingredientes.
- Lote.
- Lugar de origen o procedencia.
- Otras indicaciones obligatorias adicionales para diversas categorías o tipos de productos alimenticios. Si se trata de un producto alimenticio envasado, estas indicaciones deben figurar en el envase o en una etiqueta unida al mismo. (Grupo Latino Editores, 2008)

Uno de los objetivos principales que se persigue con la legislación alimentaria, es asegurar que los consumidores disponen de una información completa sobre los productos que adquieren. Esta información es importante desde el punto de vista sanitario y económico. Una información completa y veraz, permite comparar los productos y elegir los más competitivos. La lista de ingredientes es útil para evitar el consumo de alimentos que contienen componentes a los que un individuo puede ser alérgico. Asimismo, la indicación de los

colorantes que el alimento contiene contribuye a evitar riesgos sanitarios innecesarios en individuos alérgicos. (Potter & Hotchkiss, s,f)

Según el Reglamento Técnico Centroamericano -Etiquetado General de los alimentos previamente envasados- RTCA 67.01.07:10. Dentro de la lista de ingredientes se deberán indicar los coadyuvantes de elaboración, así como también es un requisito obligatorio adicional el etiquetado cuantitativo de los ingredientes, colocando el porcentaje de los mismos.

3.6 Efectos toxicológicos de los colorantes

Los adulterantes son sustancias químicas o biológicas que se agregan a los alimentos con la intención de reducir intencionalmente el costo de fabricación e inflar artificialmente la calidad de los alimentos que causan enfermedades a los consumidores. (Rovina, Siddiquee, & Shaarani, 2016)

Algunos colorantes alimentarios sintéticos pueden ser tóxicos para organismos acuáticos y así mismo tienen efectos cancerígenos en humanos, particularmente cuando son consumidos en exceso. Se han llevado a cabo estudios sobre diferentes colorantes, uno de ellos el Rojo Allura, el cual evidenció causar dolor de cabeza en adultos mientras que en niños se produce distracción e hiperactividad. La Opinión Científica del Panel de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) ha concluido que Rojo Allura puede causar reacciones alérgicas como urticaria y asma, especialmente cuando se mezcla con otro color sintético en productos alimenticios. (Rovina, Siddiquee, & Shaarani, 2016)

Un estudio llevado a cabo en Inglaterra determinó el efecto de 6 colorantes (Amarillo anaranjado E-110, amarillo de quinoleína E-104, Carmoisina E-122, Rojo allura AC E-129, Tartrazina E-102 y rojo cochinilla E -124) y el benzoato de sodio en bebidas refrescantes en grupos de niños de 3, 8 y 9 años de edad. Encontrándose un aumento en el Trastorno por déficit de atención (TPDA) y la hiperactividad. (Colores Alimentarios en la salud , 2012)

“La mayoría de colorantes utilizados son de origen sintético, estos son más baratos, colorean de manera más intensa y son más estables que sus contrapartes naturales. Sin embargo, hay controversia porque se ha encontrado una asociación entre estos colores artificiales y las reacciones intolerantes en niños.” (Lindsay, 1997)

El amarillo anaranjado 5 que aparece en mermeladas, galletas y productos de pastelería, refrescos de naranja, sopas instantáneas, etc. Se considera cancerígeno y frecuente alérgeno. (Sánchez, 2013)

3.7 Métodos de extracción de colorantes

3.7.1 Fibras naturales

Existen dos grupos de fibras, las artificiales que son producidas mediante síntesis química como el poliéster, entre otros y las naturales, que pueden ser de origen vegetal o animal.

3.7.2 Fibras animales

Las fibras de origen animal son muy variadas. Están compuestas por una serie de moléculas proteínicas, que son ordenaciones atómicas en estructuras alargadas, que se encuentran unidas unas a otras, éstas cadenas a su vez se encuentran enlazadas entre sí de forma paralela por eslabones laterales. Estos últimos puntos de enlaces son más débiles que las propias uniones de las cadenas, además son químicamente activos, por lo que cualquier cambio en el medio químico donde se encuentre la fibra, afectará la condición de estos puentes de enlace hasta adaptarse al nuevo medio, es decir, equilibrarse. Es posible encontrar tres tipos de puentes laterales, los salinos, los hidrogenados y los sulfurados. Los puentes salinos ocurren entre dos cadenas individuales, al coincidir áreas cargadas de radicales ácidos o básicos, son fácilmente debilitados por el agua. Por su parte los puentes de hidrógeno son los que se rompen en presencia de soluciones salinas o metálicas, dichas soluciones vienen a ser los denominados mordientes. Los puentes sulfurados son los más fuertes, aunque es posible romperlos no

conviene hacerlo, ya que la fibra se torna quebradiza e inservible. (Teñido de fibras naturales con pigmentos, 2009)

3.7.3 Lana

3.7.3.1 Propiedades químicas de la lana

- Efecto de los álcalis: la proteína de la lana, que recibe el nombre de queratina, es particularmente susceptible al daño de álcalis. Por ejemplo, soluciones de hidróxido de sodio al 5%, a temperatura ambiente, disuelven la fibra de lana.
- Efecto de los ácidos: la lana es resistente a la acción de los ácidos suaves o diluidos, pero en cambio los ácidos minerales concentrados, como por ejemplo, el sulfúrico y el nítrico provocan desdoblamiento y descomposición de la fibra. Sin embargo, soluciones diluidas de ácido sulfúrico son usados durante el proceso industrial de la lana, para carbonizar la materia vegetal adherida a las fibras.
- Efecto de los solventes orgánicos: la mayoría de los solventes orgánicos usados comúnmente para limpiar y quitar manchas de los tejidos de lana, son seguros, en el sentido que no dañan las fibras de lana.

3.7.3.2 Teñido de la lana

Se selecciona el producto del que se desea obtener el color para teñir la lana, el cual se hierve en agua y se agrega la lana mojada enmadejada, después de un período de cocción, se agrega una sustancia que fije el color como sal, vinagre, piedra lumbre o sulfato de cobre. (Franco, s.f.)

“Una de las aplicaciones primarias de los colorantes es en el teñido de la lana, mediante el desarrollo de interacciones iónicas entre los colorantes y las proteínas de la lana. A pH bajo las proteínas adquieren una carga neta positiva que forman interacciones iónicas con los colorantes ionizados, aunque también se desarrollan puentes de hidrógeno e

interacciones hidrofóbicas, reteniendo el color después del lavado. Este proceso se puede revertir al calentar la lana teñida en un álcali diluido.” (Ponce, 2012)

3.8 Métodos de Identificación

3.8.1 Cromatografía en capa fina

Para la cromatografía en capa fina (TLC) que actualmente se conoce como cromatografía en capa delgada (Christian, 2009), la fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor, fijadas sobre un soporte sólido de aluminio, plástico o vidrio. Asimismo, la fase estacionaria puede ser papel conocida como cromatografía en papel (CP), actualmente no muy utilizada por la baja resolución y poca sensibilidad (Skoog, Holler, & Crouch, 2007).

Después de aplicar el analito cerca de la parte inferior de la placa seca, el disolvente empieza a producir la separación. La ventaja principal de la TLC es que la muestra y el patrón se analizan simultáneamente, mientras que, para la cromatografía en columna, las muestras se deben analizar individual y secuencialmente (Rubinson & Rubinson, 2001).

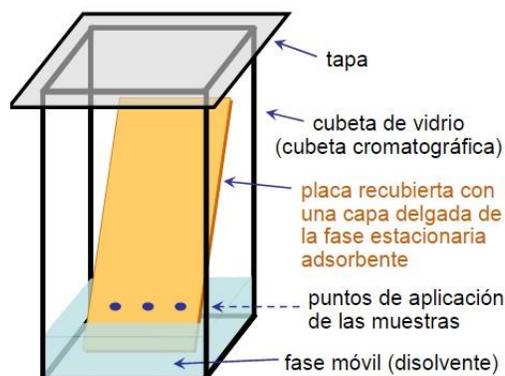
Después del desarrollo, las manchas individuales de soluto se ven o se hacen visibles tratándolas con un reactivo que forme un derivado colorido. En general, las manchas se mueven a cierta fracción de la velocidad con la que se mueve el disolvente y se caracteriza por su valor de R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distancia que recorre el soluto}}{\text{Distancia que recorre el frente del disolvente}}$$

donde las distancias se miden desde el centro donde se depositó la muestra, en el lado inferior de la placa. El frente de disolvente será una línea que cruza la placa. La distancia recorrida por el soluto se mide desde el centro de la mancha del soluto, o a su densidad máxima si se presenta corrimiento. Debido a pequeñas variaciones en las placas, siempre se aconseja determinar el valor del R_f en cada juego de placas (Christian, 2009).

3.8.2 Desarrollo del cromatograma

Imagen No.3: Disposición para la cromatografía de capa delgada



Fuente: Biomodel. (s.f.). *Cromatografía*. Obtenido de Biomodel: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/TLC-ascen.opt.svg>

En la imagen No. 3 se ve un ejemplo del dispositivo para cromatografía de capa delgada. Se traza una línea delgada con lápiz que cruce la placa algunos centímetros arriba del fondo y sobre ella se colocan los puntos de aplicación (las manchas). La mancha debe ser tan pequeña como sea posible para tener una separación máxima y un mínimo de arrastre (o prolongación excesiva). Lo mejor es hacerlo gota a gota. La placa se coloca en una cámara cerrada (a presión) para saturar la atmósfera con el disolvente y evitar que éste se evapore de la placa al ir subiendo. El desarrollo puede durar 10 minutos a 1 hora, pero no requiere tiempo de operador. La cantidad de desarrollo dependerá de la complejidad de la mezcla de solutos que se esté preparando. Si se usa una placa ancha, se pueden depositar varias muestras y patrones a lo largo del lado inferior para desarrollarlos al mismo tiempo (Christian, 2009).

Es posible obtener tiempos de desarrollo de 5 minutos usando pequeños portaobjetos como placas de TLC, y se pueden hacer separaciones preliminares con ellas para determinar cómodamente las condiciones óptimas de desarrollo. Lo normal es que los tamaños de muestra vayan de 10 a 100 μg por punto de aplicación. Los puntos de aplicación de la muestra deben tener 2 a 5 mm de diámetro.

Una de las principales ventajas de esta técnica es que puede lograrse mayor poder de separación usando la cromatografía bidimensional de capa delgada; para ello se usa una

placa grande y cuadrada, y la muestra se deposita en una de sus esquinas inferiores. Después del desarrollo con determinado sistema de disolventes, la placa se gira 90° y se sigue desarrollando con un segundo sistema de disolventes. Entonces, si no se resuelven dos o más solutos por completo con el primer disolvente, será posible con un segundo. Con frecuencia es importante hacer un buen control de pH para lograr separaciones eficientes (Christian, 2009).

3.8.3 Detección de las manchas

Se puede aplicar una diversidad de procedimientos para localizar los componentes de la muestra después de la separación. Dos de los métodos comunes, que se utilizan con la mayoría de las mezclas de sustancias orgánicas, consisten en rociar sobre la placa una solución de ácido sulfúrico o colocar la lámina en una cámara que contiene algunos cristales de yodo (Skoog, Holler , & Crouch, 2007). Sin embargo, con ello se descartan los análisis cuantitativos que podrían hacerse raspando la placa y eluyendo los compuestos para medirlos (Christian, 2009).

Si los compuestos fluorescen (compuestos aromáticos), se pueden detectar iluminando la placa con una lámpara de luz ultravioleta. Se traza una línea con lápiz, rodeando las manchas, para tener su identificación permanente. Con frecuencia se usan reactivos que desarrollen color. Por ejemplo, los aminoácidos y las aminas se detectan rociando la placa con una solución de ninhidrina, que forma un color azul o púrpura. Después de identificar las manchas, se pueden raspar y se lavan (eluyen) los solutos, para identificar cuantitativamente con un micrométodo (Christian, 2009).

3.8.4 Fases estacionarias para cromatografía de capa delgada

“Las fases estacionarias que se usan con más frecuencia son adsorbentes. Las más populares son el gel de sílice, la alúmina y la celulosa pulverizada. Las partículas de gel de sílice contienen grupos hidroxilo en su superficie que forman puentes de hidrógeno con moléculas polares. El agua adsorbida evita que otras moléculas polares lleguen a la superficie, por lo que el gel se activa por medio de calentamiento para eliminar el agua

adsorbida. También la alúmina contiene grupos hidroxilo o átomos de oxígeno. Se prefiere la alúmina para separar compuestos débilmente polares, pero el gel de sílice es preferido para compuestos polares, como aminoácidos y azúcares” (Christian, 2009).

3.8.5 Fases móviles para cromatografía de capa delgada

El poder eluyente de los disolventes incrementa al aumentar su polaridad (por ejemplo, de hexano a acetona a alcohol a agua). Siempre que sea posible, debe usarse un solo disolvente, o dos o tres cuando mucho, porque los disolventes mezclados tienden a cromatografiarse al subir por la capa delgada y causan un cambio continuo en la composición del disolvente en función de la distancia en la placa. Eso puede causar valores variables de R_f , dependiendo de hasta donde se permita subir las manchas. Los disolventes deben ser de gran pureza. La presencia de cantidades pequeñas de agua u otras impurezas pueden causar cromatogramas irreproducibles (Christian, 2009).

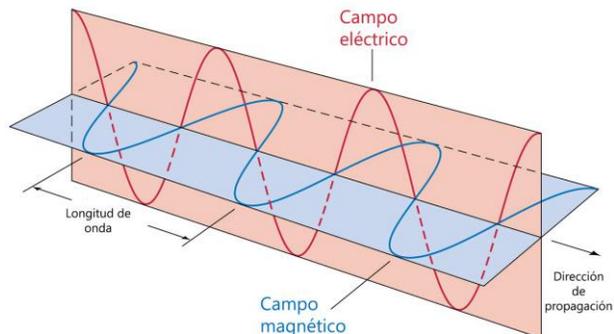
3.9 Espectrometría

La espectrometría es el conjunto de técnicas que utilizan la luz para medir las concentraciones químicas.

3.9.1 Propiedades de la luz

Es conveniente describir la luz tanto en términos de partículas como de ondas. Las ondas de luz constan de campos eléctricos y magnéticos que oscilan en planos perpendiculares entre sí. En la figura No. 2 se muestra una onda polarizada en el plano. En esta figura el campo eléctrico se encuentra en el plano xy , y el campo magnético en el plano xz . La longitud de onda, λ , es la distancia entre las crestas de dos ondas. La frecuencia, ν , es el número de oscilaciones completas de una onda en un segundo (Harris, 2013).

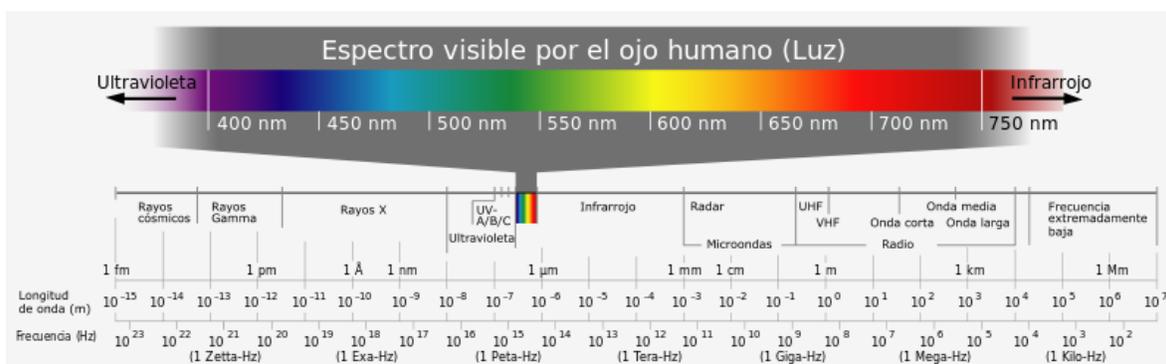
Imagen No. 4: Propiedades de la luz



Fuente: Christian, G. (2009). *Química Analítica*. México: Mc-Graw-Hill.

En la Imagen No.4 están marcadas las distintas regiones del espectro electromagnético. No hay cambios bruscos en las características de la radiación electromagnética cuando pasamos de una región a otra, por ejemplo, al pasar del visible al infrarrojo (IR). La luz visible, que es la forma de radiación electromagnética que vemos, representa solo una pequeña fracción del espectro electromagnético (Harris, 2013).

Imagen No.5: Espectro electromagnético



Fuente: Christian, G. (2009). *Química Analítica*. México: Mc-Graw-Hill.

3.9.2 Absorción de luz

Cuando una molécula absorbe un fotón aumenta la energía de la molécula. Se dice que la molécula ha pasado a un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, disminuye la energía de la molécula. El estado de mínima energía de una molécula se llama estado fundamental. La radiación de IR estimula el movimiento vibracional de las moléculas cuando la absorben, y las radiaciones visible y UV hacen que los electrones pasen a orbitales de mayor energía. Los rayos X y la radiación UV de longitud de onda corta rompen enlaces químicos y ionizan a las moléculas (Harris, 2013).

Cuando una muestra absorbe luz, la irradiancia del haz de luz disminuye. La irradiancia, P , es la energía por segundo y por unidad de área del haz de luz. La luz se hace pasar por un monocromador (prisma, red de difracción o incluso un filtro) para seleccionar una longitud de onda. La luz de una sola longitud de onda se llama monocromática, o sea, de “un color”. La luz monocromática, con una irradiancia P_0 incide en una muestra de longitud b . La irradiancia del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra es P . Como la muestra puede haber absorbido algo de luz, $P \leq P_0$.

La transmitancia, T se define como la fracción de la luz incidente que pasa a través de la muestra.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Por tanto, T puede valer de 0 a 1. El porcentaje de transmitancia es simplemente $100T$ y puede valer desde 0 a 100%. La absorbancia se define como:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T$$

Cuando no se absorbe luz, $P = P_0$ y $A = 0$. Si se absorbe el 90% de luz, se transmite el 10%, y $P = P_0/10$. Este cociente vale $A = 1$. Si solamente se transmite el 1% de luz, $A = 2$. La absorbancia es importante porque es directamente proporcional a la concentración, c , de la especie que absorbe la luz en la muestra (Harris, 2013).

3.10 Ley de Beer

$$A = \epsilon bc$$

La absorbancia es adimensional. La concentración de la muestra, c , normalmente viene dada en unidades de mol/L (M). El camino óptico, b , normalmente se expresa en centímetros. La cantidad ϵ (épsilon) se llama absorptividad molar (o coeficiente de extinción en libros antiguos y tiene unidades $M^{-1}cm^{-1}$, y así el producto ϵbc es adimensional). La absorptividad molar es la característica de una sustancia que nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada (Christian, 2009) (Harris, 2013).

La cantidad de radiación monocromática que absorbe una muestra obedece a la ley de Beer-Bourguer-Lambert, que comúnmente se conoce como ley de Beer. Esta ley, afirma que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente. La fracción de luz que pasa a través de una muestra (transmitancia) se relaciona logarítmicamente, no linealmente, con la concentración de la muestra (Harris, 2013).

3.10.1 Casos en los que no se cumple la ley de Beer

En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto interactúan entre sí debido a su proximidad. Cuando las moléculas de soluto se aproximan entre sí, sus propiedades (entre las que se encuentra la absorptividad molar) cambian. A concentraciones muy altas, los solutos se convierten prácticamente en disolvente. Las propiedades de una molécula no son exactamente las mismas en diferentes disolventes. Los solutos de una disolución que no absorben también pueden interactuar con las especies absorbentes y alterar la absorptividad. Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absorptividad cambia con la concentración (Harris, 2013).

3.10.2 Medida de la absorbancia

La luz procedente de una fuente continua pasa a través de un monocromador, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente. Esta luz “monocromática” atraviesa una muestra de camino óptico b , y mide la irradiancia de la luz que emerge.

En espectroscopía visible y UV se coloca una muestra líquida normalmente en una celda llamada cubeta, que tiene paredes lisas de sílice fundida (SiO_2). El vidrio es adecuado para espectroscopía visible, pero no para UV, porque absorbe radiación UV. Las cubetas más utilizadas tienen una longitud de camino óptico de 1.000 cm (Harris, 2013).

Cuando se registra un espectro de absorbancia, primero se registra el espectro de la línea base con las disoluciones de referencia (disolvente puro o blanco) en las dos cubetas. Si el instrumento fuese perfecto, la línea base sería siempre 0. En un mundo imperfecto, la línea base normalmente presenta pequeñas absorbancias positivas y negativas.

“En análisis espectrofotométrico, normalmente se escoge la longitud de onda de máxima absorbancia por dos razones: (1) La curva es relativamente aplanada en las proximidades del máximo, de manera que apenas varía la absorbancia si se desajusta un poco el monocromador o si varía algo la anchura de la banda escogida. La ley de Beer se cumple mejor cuando la absorbancia es casi constante a lo largo de la banda de longitudes de onda escogida. (2) La sensibilidad del análisis es máxima en el máximo de absorbancia (es decir, se consigue la máxima respuesta para una concentración dada de analito).” (Harris, 2013)

Para evitar errores de lectura es necesario mantener cubiertos todos los recipientes para que no entre polvo. El polvo dispersa la luz, que aparece como absorbancia en un espectrofotómetro. Filtrar las disoluciones finales a través de un filtro de puro muy fino puede ser necesario en trabajos críticos. Manipular las cubetas con un pañuelo fino para evitar dejar huellas de los dedos en sus caras, y mantenerlas escrupulosamente limpias. (Katz, 2009)

3.11 Validación Analítica

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. De ahí que sea necesario definir debidamente tanto las condiciones en que el procedimiento ha de emplearse como el objetivo previsto para el mismo. Por ejemplo, un proceso de fabricación validado es uno cuyo cumplimiento de lo que propone o representa hacer está

comprobado. La evidencia de validación se obtiene mediante la recolección y evaluación de datos, preferentemente desde la fase de desarrollo del proceso hasta la fase de producción inclusive. (CDER, 2016)

Todas las mediciones químicas requieren un punto de referencia. Por lo general, el material de referencia o "estándar", que son compuestos químicos específicos, se pueden comprar a un proveedor de productos químicos y, en ocasiones, de un instituto nacional de metrología. Cuando se utiliza con fines de referencia, una declaración debe acompañar el material que certifica la identidad, la pureza y su incertidumbre. (AOAC, 2013)

Los métodos instrumentales modernos dependen de la comparación de una señal de la concentración desconocida de un analito a la de una concentración conocida del mismo analito o similar. Es por ello que se requiere la disponibilidad de un estándar de referencia. En donde el procedimiento de calibración más simple requiere la preparación de una serie de soluciones estándar a partir del material de referencia, por dilución de una solución madre, cubriendo un rango razonable de respuesta de señal del instrumento.

3.11.1 Características de validación

Aunque no todas las características de validación son aplicables para todos los tipos de pruebas, las características de validación típicas son:

- Especificidad
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad)
- Rango
- Límite de cuantificación
- Límite de detección

(FDA, 2015)

“En el siguiente cuadro se muestran los parámetros de desempeño que FDA, ICH y USP recomiendan incluir en la validación y/o verificación de diferentes métodos de ensayo para productos farmacéuticos y afines (cosméticos, productos higiénicos y odontológicos, dispositivos médicos, etc.), según el propósito del ensayo. La misma metodología puede ser utilizada para varios propósitos, por lo cual se deberá hacer una validación para cada caso.” (OGA,2017)

Propósito del Ensayo/ Parámetros del Método	Identificación del analito	Determinación de impurezas y compuestos de degradación		Ensayo de Medición Disolución, Contenido/Potencia	Ensayos Específicos (ingredientes activos y preservantes)
		Cuantificación	Determinación del límite		
Exactitud	-	+	-	+	+ ⁴
Precisión - Repetibilidad	-	+	-	+	+ ⁴
Precisión - Precisión Intermedia	-	+ ¹	-	+ ¹	+ ⁴
Especificidad	+ ²	+	+	+ ⁵	+ ⁴
Límite de detección	-	- ³	+	-	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-	-
Linealidad	-	+	-	+	-
Rango	-	+	-	+	-
Robustez	-	+	- ³	+	+ ⁴

Fuente: OGA. (2007).
“Política de Selección y Validación de Métodos de ensayo.
Guatemala:
Oficina de Acreditación Guatemala.

NOTA:

(-) Significa que este parámetro normalmente no se evalúa.

(+) Significa que este parámetro normalmente se evalúa.

(1) En casos en los que se ha evaluado la reproducibilidad, no es necesaria la precisión intermedia.

(2) La falta de especificidad para un procedimiento analítico puede ser compensada agregándole un segundo procedimiento analítico.

(3) Puede ser necesario en algunos casos.

(4) Puede no ser necesario en algunos casos.

(5) La falta de especificidad para un ensayo para liberar puede ser compensado por la determinación de impurezas.

A continuación, se describen los diferentes tipos de ensayo para productos farmacéuticos y afines que se presentaron en el cuadro anterior.

- **Identificación del analito:** Aquellas pruebas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra (Análisis cualitativo). Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.
- **Determinación de impurezas:** Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar las características de pureza de la muestra.
- **Ensayo de medición:** Constituyen procedimientos de ensayo que miden propiedades del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución.
- **Ensayos específicos:** Constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que cuantifican el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada; esto incluye el análisis de materias primas y producto terminado en cuanto a ingredientes activos, preservantes y otros componentes principales. (OGA, 2007)

Según el Anexo 5 del informe 32, las características que deben tomarse en cuenta para los diferentes tipos de procedimiento analítico son las siguientes.

	CLASE A	CLASE B	CLASE C	CLASE D
		Pruebas cuantitativas	Prueba de limite	
Exactitud		X		X ^a
Precisión		X		X
Robustez	X	X	X	X
Linealidad y alcance		X		X
Selectividad	X	X	X	X
Limite de detección	X		X	
Limite de cuantificación		X		

^a Puede permitirse algún grado de sesgo

Fuente: OMS. (1992). Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Informe 32. Anexo 5. "Validación de los procedimientos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos".

Clase A: Pruebas destinadas a establecer identidad, ya sea de sustancias farmacéuticas a granel o de un ingrediente en particular en una forma farmacéutica acabada.

Clase B: Métodos destinados a detectar y cuantificar impurezas en una sustancia farmacéutica a granel o en una forma farmacéutica acabada.

Clase C: Métodos empleados para determinar cuantitativamente la concentración de una sustancia farmacéutica a granel o de un ingrediente principal en una forma farmacéutica acabada.

Clase D: Métodos empleados para evaluar las características de las formas farmacéuticas.

3.11.2 Exactitud

La exactitud del procedimiento empleado consiste en la proximidad de los resultados obtenidos al valor real. La exactitud puede determinarse aplicando el procedimiento a las muestras del material a examinarse, cuando han sido preparadas con exactitud

cuantitativa. Siempre que sea posible, esas muestras deben contener todos los componentes del material, incluyendo el analito. (OMS,1992)

La fracción o porcentaje del analito que se recupera cuando la muestra de prueba se realiza a través de todo el método es la recuperación. Los mejores materiales de referencia para determinar la recuperación son materiales de referencia certificados por analito (CRM) distribuidos por laboratorios metrológicos, pero en la mayoría de los casos el material certificado por un proveedor comercial debe ser aceptado. (AOAC, 2013)

- **Procedimiento**

Para evaluar la exactitud se deben preparar muestras en un rango que contenga al menos cinco concentraciones diferentes del analito, las cuales aproximadamente estén espaciadas entre 50% (concentración más baja) y 150% (concentración más alta) del rango de trabajo esperado. Usar por lo menos seis réplicas por concentración. Analizar muestras de acuerdo al método en cuestión, usando la matriz del producto o la matriz de la muestra ambiental. (OGA, 2007)

3.11.3 Precisión

La precisión del procedimiento es el grado de concordancia entre los resultados de los análisis individuales. Se mide por la dispersión de los resultados individuales de la media, y usualmente se expresa como una desviación patrón o como el coeficiente de variación (desviación patrón relativa) cuando el procedimiento completo se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo. (OMS, 1992)

La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La precisión debe investigarse con muestras homogéneas y auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea, puede investigarse utilizando muestras preparadas artificialmente o una solución de muestra. La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones.

- ✓ La *repetibilidad* expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad también se denomina precisión intraensayo.
- ✓ La *precisión intermedia* expresa las variaciones dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- ✓ La *reproducibilidad* expresa la precisión entre los laboratorios (estudios colaborativos, generalmente aplicados a la estandarización de la metodología). (FDA, 2010)

- **Procedimiento**

Hay dos posibles procedimientos a seguir para determinar la precisión intraensayo, o repetibilidad, trabajando con submuestras de una misma muestra homogénea, bajo las mismas condiciones de operación a lo largo de un intervalo corto de tiempo:

- ✓ Hacer un mínimo de 9 determinaciones que cubran el intervalo especificado para el análisis, esto es, 3 réplicas a cada una de 3 concentraciones diferentes.
- ✓ Hacer un mínimo de 6 determinaciones a una concentración que corresponda con la de la muestra problema. (OGA, 2007)

3.11.4 Linealidad y alcance

La linealidad de un procedimiento analítico es la posibilidad de que éste produzca resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. El alcance del procedimiento es una expresión de los niveles más bajo y más alto de analito que, según se haya demostrado, pueden ser determinables con precisión, exactitud, y linealidad aceptable. Estas características son determinadas mediante la aplicación del procedimiento a una serie de muestras que tienen concentraciones de analito que cubren el alcance atribuido al procedimiento. (OMS, 1992)

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. Para el establecimiento de la linealidad, se recomienda un mínimo de 5 concentraciones. (FDA, 2010)

“Para verificar la linealidad, se debe preparar las soluciones individuales por dilución de una solución madre común para evitar los errores aleatorios que probablemente se introducirán al pesar pequeñas (mg) cantidades para estándares individuales. Siempre que la pureza del material de referencia sea del 95%. A menudo se recomienda un alto coeficiente de correlación (p. Ej., > 0,99).” (AOAC, 2013)

- **Procedimiento**

Preparar soluciones patrón de por lo menos cinco diferentes concentraciones del analito, que estén distribuidas regularmente y que cubran del 50% (concentración más baja) al 150% (concentración más alta) del intervalo de trabajo esperado. Los rangos del 75% al 125% no son atípicos de la industria farmacéutica. Usar por lo menos seis réplicas por concentración. Las soluciones patrón deberían prepararse en la misma matriz utilizada con las muestras, si es posible. Analizar las soluciones patrón conforme el método en cuestión. (OGA, 2007)

3.11.5 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal. (FDA, 2010)

- **Procedimiento**

La determinación de la capacidad del método para no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones de trabajo, se logra al considerar aquellas condiciones que, durante el desarrollo del método, se vió que pueden afectar los resultados. El procedimiento es específico para cada caso; por ejemplo, para un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución, se evalúa el efecto de pequeñas variaciones en el tiempo de extracción del analito, durante la preparación de las muestras, y en el pH y la composición de la fase móvil, así como la columna y las condiciones de temperatura y flujo, durante el trabajo cromatográfico; también se evalúa el centrifugar las muestras en vez de filtrarlas, el usar diferentes tipos de filtros y la estabilidad de las soluciones patrón y de muestra. (OGA, 2007)

4. JUSTIFICACIÓN

Las mermeladas son un producto alimenticio que se consume frecuentemente en la ciudad de Guatemala, debido a que estas ya están listas para consumir, y la facilidad con la que se pueden adquirir en el supermercado, las hacen un producto de alta demanda. En la actualidad por parte de las entidades regulatorias, existe poco control sobre los productos alimenticios que contienen colorantes artificiales en su composición, las mermeladas entre uno de ellos; mismos de los cuales se ha evidenciado que pueden producir alteraciones en la salud de las personas, hasta el punto de adquirir enfermedades de tipo cancerígenas.

Según el Reglamento Técnico Centroamericano de Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios (RTCA) 67.04.54:10, en mermeladas el nivel máximo de colorantes artificiales: Rojo Allura FD&C rojo No. 40 (16,035) no deberá exceder los 500 mg/Kg y para Amarillo Ocaso FD&C amarillo No. 6 (15,985) el límite máximo es de 300 mg/Kg.

Entre la población que consumen este tipo de alimentos se encuentran desde niños hasta personas de la tercera edad; los niños y las personas de la tercera edad constituyen un blanco importante en la adquisición de mermeladas, ya que muchas veces requieren dietas livianas a base de productos no sólidos en su alimentación diaria. Dado que las estrategias de marketing pretenden atraer al consumidor con productos altamente atractivos a la vista, los colorantes artificiales juegan un papel importante en este ámbito.

En esta investigación se pretendió identificar y cuantificar los colorantes artificiales en mermeladas de fresa distribuidas en la Ciudad Capital de Guatemala, con el fin de determinar si dichos colorantes se encuentran dentro de los límites establecidos por el RTCA de Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios (RTCA) 67.04.54:10. Así mismo, llevar a cabo la validación de la metodología, con el fin de que los resultados obtenidos sean reproducibles y que se garantice que la cuantificación se está llevando a cabo de manera exacta y precisa obteniendo así resultados verídicos.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar que los colorantes artificiales indicados en la etiqueta de las mermeladas de fresa en presentación de tarro de vidrio de 290gr, distribuidas en la ciudad de Guatemala, cumplan con los límites establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano -Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios- RTCA 67.04.54:10.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Validar la metodología de cuantificación evaluando los parámetros de linealidad, precisión, robustez y exactitud.
- 5.2.2 Verificar que el proceso de extracción de los colorantes utilizando lana de oveja pueda recuperar la mayor cantidad de colorante determinando el porcentaje de recobro.
- 5.2.3 Identificar y cuantificar los colorantes artificiales presentes en las mermeladas de fresa.
- 5.2.4 Verificar que las etiquetas respectivas para las distintas mermeladas de fresa cumplan con las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano -Etiquetado General de los alimentos previamente envasados- RTCA 67.01.07:10.

6. HIPÓTESIS

Las mermeladas de fresa en presentación de tarro de vidrio de 290g distribuidos en la Ciudad Capital de Guatemala cumplen con los límites permitidos de colorantes artificiales según el Reglamento Técnico Centroamericano -Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios- RTCA 67.04.54:10.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de Trabajo: Mermeladas de fresa.

7.2 Muestra: Mermeladas de fresa en presentación de tarro de vidrio de 290g distribuidas en la Ciudad Capital de Guatemala.

7.3 Recursos:

7.3.1 Recursos Humanos:

7.3.1.1 Investigadora: Sindy Alejandra Palacios Castillo

7.3.1.2 Asesora: Licda. Julia Amparo García Bolaños

7.3.1.3 Revisora: Licda. Aylin Santizo Juárez

7.3.2 Recursos Materiales:

7.3.2.1 Mermeladas de fresa recolectadas en los diferentes supermercados de la Ciudad Capital de Guatemala.

7.3.2.2 Instalaciones y equipo de laboratorio del Departamento de Análisis Aplicado.

7.3.3 Equipo de Laboratorio:

- Balanza Analítica OHAUS Adventurer
- Estufa Eléctrica Cole-Parmer Spin Master Model 4803
- Centrifugadora Zeny 800-1
- Espectrofotómetro UV-VIS Thermo Scientific Genesys 10S
- Potenciómetro BANTE PHS-25CW/3BW
- Equipo general para cromatografía en capa fina
- Campana de Extracción

7.3.4 Materiales de Laboratorio:

- Lana desengrasada
- Balones aforados de 10, 25, 50 y 100 mL
- Beakers de 50mL

- Beakers de 100 mL
- Beakers de 250 mL
- Probeta de 25mL
- Pipetas volumetricas 1mL, 2mL, 3mL, 4mL, 5mL, 10mL
- Embudo de vidrio
- Kitasato
- Manguera para filtrar al vacío
- Embudo de Büchner
- Microcapilares
- Masking tape
- Papel filtro
- Micropipetas
- Placas cromatográficas
- Varillas de vidrio
- Pizeta
- Pipeteador
- Papel encerado
- Papel limpiantes
- Papel Kraft

7.3.5 Reactivos:

- Ácido acético al 96% GR
- Agua destilada
- Alcohol etílico al 95% GR
- Hidróxido de sodio al 15% GR
- Hidróxido de amonio concentrado GR
- Fase Móvil: n-butanol, etanol, amoníaco, agua.

7.3.6 Estándares de Colorantes

- FD&C Rojo No.40 (Rojo Allura) Lote: 30710
- FD&C Amarillo No.6 (Amarillo Ocaso) Lote: 28734

7.4 Metodología

7.4.1 Procedimiento de recolección de muestras:

Se recolectaron 3 lotes diferentes de 3 marcas de mermeladas distribuidas en la ciudad capital de Guatemala. Dos muestras de diferente supermercado por lote, para tener un total de 18 muestras de mermeladas de fresa en presentación de 290g para evaluar. Identificándolas como marca A, B y C. Lote 1, 2 y 3. Y al tener dos muestras por lote la nomenclatura de 1-1 y 1-2 indicando muestra 1 y muestra 2 de un mismo lote, por ejemplo.

7.4.2 Procedimiento de Validación, identificación y cuantificación:

La validación de la metodología se dividió en cuatro etapas, incluyendo así mismo la respectiva identificación y cuantificación de las muestras.

7.4.2.1 Etapa 1: Curvas de calibración e identificación de longitudes de onda máxima

- Se prepararon soluciones estándar a partir de una solución madre de 0.025% de cada uno de los colorantes artificiales a analizar, amarillo No.6 y rojo No. 40.
- En cinco balones aforados de 50 mL, se midió de 1 a 5 mL de la solución madre y se aforó a 50 mL con agua desmineralizada, para cada uno de los colorantes a evaluar.
- Se llevó a cabo un barrido en el UV-VIS para identificar la longitud de onda a la cual cada colorante artificial poseía mayor absorbancia.
- Se elaboraron 6 curvas de calibración para cada colorante artificial, con los estándares de cada colorante por separado a cinco concentraciones diferentes. Debido a que en las muestras de mermeladas hay mezclas de colorantes, en la validación se leyeron las

curvas de calibración a las longitudes de onda máximas de cada colorante a evaluar para su adecuada cuantificación.

- Para el tratamiento de resultados se calcularon los valores de la ecuación de la recta y valores de r^2 . Se analizaron los resultados y se obtuvo el parámetro de linealidad.

7.4.2.2 Etapa 2: Tratamiento de lana y porcentaje de recobro

- Se llevó a cabo el desengrasado de la lana con solución de hidróxido de sodio al 15%, sumergiéndola en la solución por 1 minuto, posteriormente se lavó con alcohol etílico al 95% por 30 segundos para eliminar el restante de grasa que pudiera quedar y por último se lavó con abundante agua desmineralizada, verificando que el pH de la lana fuera neutro y no básico. Finalmente se dejó secar la lana sobre papel kraft.
- Se prepararon soluciones estándar a partir de seis soluciones madre de 0.025% de cada uno de los colorantes artificiales a analizar.
- En cinco balones aforados de 50 mL, se midieron de 1 a 5 mL de la solución madre y se aforó a 50 mL con agua desmineralizada, realizando así las curvas de calibración para cada colorante.
- Se leyeron las absorbancias de las curvas de calibración en el UV-VIS y se elaboraron las ecuaciones de la recta, obteniendo valores de r^2 .
- Se sometieron las soluciones de las diferentes curvas de calibración a extracción del colorante a través de la lana. Agregando 10mL de cada solución hija coloreada en beaker de 50mL y agregando un trozo de lana con un peso aproximado de 0.5 – 1.0g, se adicionó 10 gotas de ácido acético al 96% y se sometió a calentamiento por 20 minutos sin dejar que hirviera.
- Se dejó enfriar la solución para luego sacar la lana y lavarla con agua desmineralizada fría para fijar los colorantes, hasta que no se percibiera olor a ácido acético.

- Se trasladó la lana a un beaker de 50mL y se agregaron 10 mL de agua desmineralizada y 15 gotas de hidróxido de amonio concentrado (amoníaco). Se llevó a calentamiento suavemente por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por último, se exprimió la lana perfectamente sobre la solución resultante llevándola a un tubo de ensayo para colocarlo en la centrifugadora.
- Se centrifugaron las soluciones obtenidas por 10 minutos a 1000rpm con el fin de que los restos de lana quedaran como sedimento.
- Posteriormente las soluciones resultantes se filtraron al vacío a través de un filtro de papel colocado en un embudo de Büchner; obteniendo la solución en un kitasato.
- Por último, se llevó la solución coloreada a un balón aforado de 10mL y se llevó al aforo realizando pequeños lavados al embudo con agua destilada.
- A través del espectrofotómetro UV-VIS se leyó la absorbancia de la solución y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el porcentaje de recobro.

7.4.3 Etapa 3: Identificación y Cuantificación de colorantes en Mermeladas

- Se pesó aproximadamente 5 g de muestra de mermelada de fresa en un beaker de 50mL y se agregaron 10mL de agua destilada, se dejó reposar por 15 minutos agitando eventualmente con una varilla de vidrio. Posteriormente se trasvasó a un balón aforado de 25mL y se aforó con agua destilada.
- Los 25mL se filtraron a través de papel filtro y un embudo, obteniendo la solución en un beaker de 50mL. Se agregó un trozo de lana desengrasada de 0.5g-1.0g y se adicionaron 20 gotas de ácido acético 96%. Se calentó por 20 minutos sin que hirviera y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se sacó la lana y se lavó con agua desmineralizada fría para fijar los colorantes, hasta que no se percibiera olor a ácido acético.

- Se trasladó la lana a un beaker de 50mL y se agregaron 10 mL de agua desmineralizada y 20 gotas de hidróxido de amonio concentrado (amoníaco). Se llevó a calentamiento suavemente por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por último, se exprimió la lana perfectamente sobre la solución resultante llevándola a un tubo de ensayo para colocarlo en la centrifugadora.
- Se centrifugaron las soluciones obtenidas por 10 minutos a 1000rpm con el fin de que los restos de lana quedaran como sedimento.
- Posteriormente las soluciones resultantes se filtraron al vacío a través de un filtro de papel colocado en un embudo de Büchner y obteniendo la solución en un kitasato.
- Por último, se llevó la solución coloreada a un balón de 10mL y se aforó realizando pequeños lavados al embudo con agua destilada. Esta solución es *“la solución coloreada final”* la cual sirvió para llevar a cabo la identificación, la cuantificación y más adelante la que sirvió para verificar cambios en longitud de onda y pH.

7.4.3.1 Identificación:

- Con tubos microcapilares se agregaron 10 microlitros de *“la solución coloreada final”* obtenida de la muestra en la placa cromatográfica a una distancia de por lo menos 10 mm entre cada mancha, junto con los estándares de los 2 colorantes declarados en la etiqueta, se dejaron secar las manchas y se procedió a la identificación de las muestras.
- Se colocó la mezcla de solventes para la fase móvil; n-butanol, etanol, hidróxido de amonio, agua desmineralizada (25:13:5:7) dentro de la cámara cromatográfica y se esperó 1 hora para alcanzar una saturación adecuada dentro de la misma.
- Posteriormente se sumergió la placa cromatográfica y se dejó correr la fase móvil hasta que alcanzara el frente del solvente aproximadamente 1.5 cm antes de llegar al final de la placa.

- Se sacó la placa para secarse dentro de la campana de extracción, identificando con un lápiz las manchas obtenidas para medir y calcular los valores de Rf. Se compararon los valores Rf y color en los cromatogramas de las muestras y estándares, interpretando así los resultados.

7.4.3.2 Análisis cuantitativo:

- Se prepararon soluciones estándar a partir de una solución madre de 0.025% de cada uno de los colorantes artificiales a analizar, amarillo No.6 y rojo No. 40 (declarados en la etiqueta).
- En cinco balones aforados de 50 mL, se midió de 1 a 5 mL de la solución madre y se aforó a 50 mL con agua desmineralizada, construyendo así una curva de calibración para cada colorante.
- Debido a la mezcla de colorantes en las muestras, se leyeron las absorbancias de las curvas de calibración a las longitudes de onda máximas de ambos colorantes.
- Posteriormente se realizó la lectura de absorbancia de *“la solución coloreada final”* aforada en el balón de 10mL de la muestra de mermelada, llevándose a cabo el mismo procedimiento para cada una de las muestras de mermeladas. Tomando siempre en cuenta que las lecturas debían realizarse a las longitudes de onda máxima de ambos colorantes.
- Se llevaron a cabo los cálculos correspondientes para observar la precisión y el cumplimiento de las mermeladas con los límites de colorantes establecidos.

7.4.4 Etapa 4: Cambios en longitud de onda y pH

- A *“la solución coloreada final”* obtenida en el procedimiento de identificación y cuantificación para cada muestra de mermelada, se le tomaron lecturas de absorbancias a 3nm por encima y 3nm por debajo de la longitud de onda máxima establecida para cada colorante. Obteniendo resultados para verificar el parámetro de robustez.

- Así mismo se llevó a cabo nuevamente todo el procedimiento para identificación y cuantificación de los colorantes en cada muestra de mermelada, pero con el fin de variar el pH y observar su comportamiento. Por lo que a la *“solución coloreada final”* obtenida se le varió el pH adicionando 1 gota de hidróxido de amonio para elevar 0.2 el valor normal y se elaboró una mezcla de 2.5mL de agua y 1mL de ácido acético para bajar 0.2 el valor normal de pH para cada muestra.
- Se realizaron lecturas de la absorbancia a los diferentes pH para observar el comportamiento de las muestras. Verificando así mismo el parámetro de robustez.

8. RESULTADOS

Con el objetivo de identificar la longitud de onda en la que presentan el máximo de absorción los colorantes a evaluar se realizó un barrido espectrofotométrico en el UV-Visible Thermo Scientific Genesys 10S con diluciones de cada uno de los estándares de los colorantes.

Cuadro No. 5: Longitud de onda en la que presentaron mayor absorbancia cada estándar de colorante artificial.

Colorante	Longitud de onda máxima absorbancia
FD&C Amarillo No.6 (Amarillo Ocaso)	485nm
FD&C Rojo No.40 (Rojo Allura)	496nm

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

8.1 Linealidad

Se llevaron a cabo 6 soluciones madre para cada colorante, de las cuales se obtuvieron curvas de calibración para observar la linealidad esperando un coeficiente de determinación cercano a 1 y no menor a 0.9996.

Cuadro No.6: Regresión lineal y coeficientes de determinación de curvas de calibración de colorantes.

Colorante	Curva	Ecuación de la curva a 485nm	Coefficiente de determinación r^2	Ecuación de la curva a 496nm	Coefficiente de determinación r^2
Amarillo 6	1	$y = 21195x + 0.0174$	0.9999	$y = 20115x + 0.0184$	0.9999
	2	$y = 21219x + 0.013$	0.9998	$y = 20179x + 0.0124$	0.9998
	3	$y = 21174x + 0.0023$	0.9999	$y = 20071x + 0.0012$	0.9999
	4	$y = 21296x - 0.0016$	0.9998	$y = 20197x - 0.0015$	0.9998
	5	$y = 21394x - 0.0013$	0.9999	$y = 20286x - 0.0015$	0.9999
	6	$y = 21443x + 0.0077$	0.9999	$y = 20367x + 0.0083$	0.9999
Rojo 40	1	$y = 18416x - 0.0009$	0.9999	$y = 20697x + 0.0026$	0.9999
	2	$y = 18348x + 0.0003$	0.9999	$y = 20611x + 0.0044$	0.9999
	3	$y = 18177x + 0.0027$	0.9999	$y = 20421x + 0.0067$	0.9999
	4	$y = 18703x + 0.0008$	0.9999	$y = 20977x + 0.007$	0.9999
	5	$y = 18679x + 0.0019$	0.9998	$y = 20961x + 0.0085$	0.9998
	6	$y = 18517x + 0.0035$	0.9998	$y = 20752x + 0.0103$	0.9998

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

8.2 Precisión

Se analizaron los diferentes lotes de muestras de mermeladas, 3 lotes por cada marca y se llevó a cabo un total de 3 repeticiones para cada lote. Calculando así el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Debido a que se analizan dos colorantes se observan los cuadros de resultados para la precisión de cada colorante a su respectiva longitud de onda.

Cuadro No.7: Precisión para el colorante Rojo No.40 a 496nm en mermeladas de fresa marca A.

Marca	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Peso g	Absorbancia	Peso g	Absorbancia	Peso g	Absorbancia
A	5.0100	0.327	5.0054	0.302	5.0327	0.320
	5.0858	0.317	5.0465	0.311	5.0412	0.309
	5.0001	0.332	5.0648	0.322	5.0108	0.317
Promedio	5.0319	0.325	5.0389	0.311	5.0282	0.315
Desviación estándar		6.24E-03		8.18E-03		4.64E-03
Coeficiente variación (%)		1.92		2.62		1.47

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.8: Precisión para el colorante Rojo No.40 a 496nm en mermeladas de fresa marca B.

Marca	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Peso g	Absorbancia	Peso g	Absorbancia	Peso g	Absorbancia
B	5.0184	0.515	5.037	0.431	5.0874	0.467
	5.0134	0.487	5.0055	0.448	5.0929	0.481
	5.0404	0.499	5.0451	0.434	5.0504	0.478
Promedio	5.0240	0.500	5.0292	0.437	5.0769	0.475
Desviación estándar		1.15E-02		7.41E-03		6.02E-03
Coeficiente variación (%)		2.29		1.69		1.27

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.9: Precisión para el colorante Amarillo No.6 a 485nm en mermeladas de fresa marca B.

Marca	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Peso g	Absorbancia	Peso g	Absorbancia	Peso g	Absorbancia
B	5.0184	0.526	5.0055	0.454	5.0874	0.480
	5.0134	0.503	5.0451	0.435	5.0929	0.486
	5.0404	0.502	5.037	0.440	5.0504	0.494
Promedio	5.0240	0.5103	5.0292	0.443	5.0769	0.487
Desviación estándar		1.11E-02		8.04E-03		5.73E-03
Coeficiente variación (%)		2.17		1.82		1.18

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

En cuanto al colorante Amarillo No.6 se puede observar que únicamente se muestra la precisión para mermeladas de fresa marca B ya que es la única marca que presenta una mezcla de colorantes, tanto Rojo No.40 como amarillo No.6.

8.3 Robustez

Para verificar la robustez del método en cuanto a la variabilidad de la longitud de onda se leyó la absorbancia de las muestras a la longitud de onda máxima reportada, siendo 485nm para amarillo No.6 y 496nm para rojo No. 40 y se leyó la absorbancia obtenida hasta 3nm por debajo y hasta 3nm por encima de la longitud de onda máxima. Llevando a cabo el mismo procedimiento por triplicado. De manera que la letra A o B indica la marca, la numeración 1, 2 ó 3 indica el lote habiendo dos muestras para cada lote.

Cuadro No.10: Absorbancia a diferente longitud de onda para Amarillo No.6 y Rojo No.40 en mermeladas de fresa marca (A) y marca (B). Repetición 1.¹

Muestra	Peso g	abs 482nm	abs 483nm	abs 484nm	absorbancia a 485nm	abs 486nm	abs 487nm	abs 488nm
B1-1	5.0425	0.454	0.453	0.452	0.452	0.451	0.45	0.449
B1-2	5.0184	0.558	0.558	0.557	0.556	0.555	0.554	0.553
B2-1	5.037	0.443	0.442	0.441	0.440	0.440	0.439	0.438
B2-2	5.0055	0.457	0.456	0.455	0.454	0.453	0.452	0.451
B3-1	5.0238	0.452	0.451	0.450	0.450	0.449	0.449	0.448
B3-2	5.0331	0.463	0.463	0.462	0.462	0.461	0.460	0.460
Muestra	Peso g	abs 493 nm	abs 494nm	abs 495nm	absorbancia a 496nm	abs 497nm	abs 498nm	abs 499nm
A1-1	5.0083	0.368	0.367	0.366	0.366	0.365	0.364	0.363
A1-2	5.1147	0.306	0.305	0.304	0.304	0.303	0.302	0.300
A2-1	5.0054	0.304	0.304	0.303	0.302	0.301	0.300	0.299
A2-2	5.1287	0.403	0.402	0.401	0.400	0.400	0.399	0.398
A3-1	5.0412	0.312	0.311	0.310	0.309	0.308	0.307	0.305
A3-2	5.0108	0.319	0.318	0.317	0.317	0.316	0.315	0.314
B1-1	5.0425	0.445	0.444	0.443	0.443	0.441	0.440	0.440
B1-2	5.0184	0.549	0.548	0.547	0.545	0.544	0.542	0.540
B2-1	5.037	0.434	0.433	0.432	0.431	0.430	0.429	0.427
B2-2	5.0055	0.450	0.450	0.449	0.448	0.447	0.446	0.445
B3-1	5.0238	0.444	0.442	0.441	0.441	0.439	0.438	0.436
B3-2	5.0331	0.456	0.456	0.455	0.455	0.453	0.452	0.451

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

¹El procedimiento desde el pesado hasta la cuantificación se llevó a cabo por triplicado en cada muestra de mermelada de fresa. Es por ello que se observa repetición 1,2 ó 3.

Cuadro No.11: Absorbancia a diferente longitud de onda para Amarillo No.6 y Rojo No.40 en mermeladas de fresa marca (A) y (B). Repetición 2.¹

Muestra	Peso g	abs 482nm	abs 483nm	abs 484nm	absorbancia a 485nm	abs 486nm	abs 487nm	abs 488nm
B1-1	5.0608	0.400	0.399	0.398	0.398	0.398	0.397	0.397
B1-2	5.0089	0.424	0.424	0.425	0.425	0.426	0.426	0.426
B2-1	5.0094	0.378	0.379	0.380	0.380	0.380	0.380	0.380
B2-2	5.0008	0.472	0.472	0.471	0.471	0.471	0.469	0.469
B3-1	5.0173	0.425	0.425	0.425	0.424	0.424	0.423	0.422
B3-2	5.0874	0.480	0.480	0.480	0.480	0.480	0.480	0.479
Muestra	Peso g	abs 493 nm	abs 494nm	abs 495nm	absorbancia a 496nm	abs 497nm	abs 498nm	abs 499nm
A1-1	5.0100	0.331	0.329	0.329	0.327	0.326	0.325	0.324
A1-2	5.0858	0.319	0.318	0.317	0.317	0.316	0.315	0.313
A2-1	5.0909	0.391	0.389	0.386	0.384	0.382	0.380	0.380
A2-2	5.0783	0.352	0.352	0.351	0.350	0.349	0.349	0.347
A3-1	5.0503	0.362	0.360	0.359	0.358	0.356	0.355	0.353
A3-2	5.0327	0.322	0.321	0.321	0.320	0.319	0.318	0.317
B1-1	5.0608	0.394	0.393	0.392	0.391	0.390	0.389	0.388
B1-2	5.0089	0.426	0.426	0.425	0.425	0.424	0.423	0.423
B2-1	5.0094	0.379	0.378	0.378	0.377	0.376	0.376	0.375
B2-2	5.0008	0.465	0.463	0.462	0.460	0.459	0.458	0.457
B3-1	5.0173	0.419	0.418	0.417	0.416	0.414	0.414	0.412
B3-2	5.0874	0.470	0.469	0.468	0.467	0.465	0.464	0.463

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.12: Absorbancia a diferente longitud de onda para Amarillo No.6 y Rojo No.40 en mermeladas de fresa marca (A) y (B). Repetición 3.¹

Muestra	Peso g	abs 482nm	abs 483nm	abs 484nm	absorbancia a 485nm	abs 486nm	abs 487nm	abs 488nm
B1-1	5.0134	0.507	0.505	0.504	0.503	0.502	0.501	0.499
B1-2	5.0404	0.500	0.501	0.502	0.502	0.503	0.503	0.503
B2-1	5.0451	0.434	0.435	0.435	0.435	0.435	0.435	0.435
B2-2	5.0218	0.493	0.494	0.495	0.495	0.496	0.496	0.496
B3-1	5.0929	0.486	0.486	0.487	0.486	0.486	0.486	0.486
B3-2	5.0504	0.495	0.495	0.495	0.494	0.494	0.493	0.493
Muestra	Peso g	abs 493 nm	abs 494nm	abs 495nm	absorbancia a 496nm	abs 497nm	abs 498nm	abs 499nm
A1-1	5.0001	0.334	0.333	0.333	0.332	0.331	0.33	0.329
A1-2	5.0663	0.340	0.339	0.337	0.336	0.335	0.334	0.332
A2-1	5.0465	0.315	0.314	0.313	0.311	0.31	0.309	0.307
A2-2	5.0648	0.326	0.324	0.323	0.322	0.321	0.320	0.319
A3-1	5.022	0.398	0.396	0.394	0.393	0.391	0.390	0.388
A3-2	5.032	0.355	0.353	0.352	0.351	0.350	0.350	0.348
B1-1	5.0134	0.492	0.491	0.489	0.487	0.486	0.484	0.482
B1-2	5.0404	0.502	0.501	0.5	0.499	0.498	0.496	0.495
B2-1	5.0451	0.435	0.435	0.435	0.434	0.434	0.434	0.433
B2-2	5.0218	0.495	0.495	0.494	0.493	0.492	0.491	0.490
B3-1	5.0929	0.483	0.482	0.481	0.481	0.480	0.478	0.477
B3-2	5.0504	0.481	0.480	0.479	0.478	0.477	0.476	0.475

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

¹El procedimiento desde el pesado hasta la cuantificación se llevó a cabo por triplicado en cada muestra de mermelada de fresa. Es por ello que se observa repetición 1,2 ó 3.

Así también, para observar que tan robusto es el método en cuanto al pH, se midió el pH de la muestra original y se midió también su respectiva absorbancia. Posteriormente se modificó el pH 0.2 por encima y por debajo del valor normal y se volvió a medir la absorbancia para observar los cambios que presentaba.

Cuadro No.13: Absorbancias de muestras de mermeladas a diferente valor de pH. Repetición 1.¹

Muestra	pH -0.2	absorbancia a 496nm	pH normal	absorbancia a 496nm	pH +0.2	absorbancia a 496nm
A1-1	9.25	0.198	9.45	0.183	9.65	0.183
A1-2	9.41	0.226	9.6	0.217	10.01	0.219
A2-1	9.32	0.165	9.51	0.154	9.75	0.156
A2-2	9.4	0.245	9.63	0.239	9.86	0.241
A3-1	9.31	0.207	9.56	0.199	9.78	0.203
A3-2	9.25	0.226	9.48	0.222	9.62	0.222
B1-1	9.51	0.270	9.76	0.265	9.91	0.267
B1-2	9.6	0.369	9.89	0.364	10.03	0.365
B2-1	9.45	0.333	9.67	0.328	9.81	0.327
B2-2	9.63	0.314	9.8	0.309	10.02	0.306
B3-1	9.49	0.285	9.71	0.279	9.97	0.282
B3-2	9.29	0.311	9.52	0.305	9.71	0.307

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.14: Absorbancias de muestras de mermeladas a diferente valor de pH. Repetición 2.¹

Muestra	pH -0.2	absorbancia a 496nm	pH normal	absorbancia a 496nm	pH +0.2	absorbancia a 496nm
A1-1	9.17	0.207	9.35	0.196	9.55	0.198
A1-2	9.32	0.239	9.5	0.230	9.73	0.233
A2-1	9.24	0.168	9.46	0.157	9.68	0.159
A2-2	9.41	0.247	9.6	0.239	9.81	0.241
A3-1	9.22	0.221	9.4	0.213	9.65	0.213
A3-2	9.18	0.231	9.33	0.225	9.57	0.229
B1-1	9.00	0.276	9.26	0.269	9.43	0.273
B1-2	9.25	0.359	9.42	0.353	9.68	0.353
B2-1	9.15	0.314	9.34	0.309	9.56	0.311
B2-2	9.36	0.296	9.51	0.289	9.76	0.288
B3-1	9.21	0.299	9.43	0.291	9.62	0.292
B3-2	9.55	0.309	9.7	0.302	9.97	0.303

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

¹El procedimiento desde el pesado hasta la cuantificación se llevó a cabo por triplicado en cada muestra de mermelada de fresa. Es por ello que se observa repetición 1,2 ó 3.

Cuadro No.15: Absorbancias de muestras de mermeladas a diferente valor de pH. Repetición 3.¹

Muestra	pH -0.2	absorbancia a 496nm	pH normal	absorbancia a 496nm	pH +0.2	absorbancia a 496nm
A1-1	9.4	0.201	9.61	0.190	9.82	0.193
A1-2	9.23	0.214	9.45	0.210	9.67	0.208
A2-1	9.15	0.157	9.34	0.149	9.5	0.151
A2-2	9.54	0.239	9.7	0.234	9.98	0.236
A3-1	9.25	0.206	9.43	0.198	9.66	0.201
A3-2	9.35	0.218	9.56	0.213	9.78	0.213
B1-1	9.52	0.280	9.72	0.274	9.99	0.276
B1-2	9.16	0.356	9.33	0.349	9.56	0.351
B2-1	9.26	0.312	9.44	0.307	9.61	0.307
B2-2	9.34	0.308	9.51	0.303	9.74	0.305
B3-1	9.25	0.309	9.48	0.305	9.65	0.304
B3-2	9.2	0.299	9.45	0.293	9.69	0.296

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

¹El procedimiento desde el pesado hasta la cuantificación se llevó a cabo por triplicado en cada muestra de mermelada de fresa. Es por ello que se observa repetición 1,2 ó 3.

8.2 Exactitud

Se llevaron a cabo 6 soluciones madre a partir de los estándares para cada colorante, de las cuales se elaboraron 6 curvas de calibración con 5 concentraciones diferentes. Luego de obtener los valores de absorbancias de las curvas se puso a prueba cada curva de calibración extrayendo el colorante a través de lana de oveja y volviendo a leer su absorbancia con el fin de observar el porcentaje de recuperación.

Cuadro No.16: Porcentajes de recuperación para el colorante Amarillo No.6 a 485nm y 496nm

Concentración	Absorbancia a 485nm	% recuperación	Absorbancia a 496nm	% recuperación
1.11062E-07	0.255	106%	0.241	105%
2.22124E-07	0.502	105%	0.474	104%
3.33186E-07	0.661	93%	0.645	95%
4.44248E-07	0.876	92%	0.825	91%
5.5531E-07	1.085	91%	1.03	91%
1.11504E-07	0.251	97%	0.246	104%
2.23009E-07	0.506	102%	0.477	102%
3.34513E-07	0.668	91%	0.632	91%
4.46018E-07	1.022	105%	1.008	109%
5.57522E-07	1.139	94%	1.083	94%
1.11504E-07	0.237	95%	0.232	98%
2.23009E-07	0.456	93%	0.444	95%
3.34513E-07	0.71	97%	0.673	97%
4.46018E-07	0.934	96%	0.937	102%
5.57522E-07	1.189	98%	1.161	101%
1.11947E-07	0.254	104%	0.251	108%
2.23894E-07	0.526	109%	0.499	108%
3.35841E-07	0.695	96%	0.658	95%
4.47788E-07	0.948	98%	0.898	98%
5.59735E-07	1.135	94%	1.123	98%
1.11947E-07	0.248	103%	0.241	105%
2.23894E-07	0.451	93%	0.440	96%
3.35841E-07	0.669	92%	0.635	92%
4.47788E-07	0.896	93%	0.891	97%
5.59735E-07	1.171	97%	1.124	98%
1.11504E-07	0.267	105%	0.259	106%
2.23009E-07	0.508	103%	0.482	103%
3.34513E-07	0.712	97%	0.672	96%
4.46018E-07	0.886	91%	0.848	92%
5.57522E-07	1.149	95%	1.057	92%

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No. 17: Porcentajes de recuperación para el colorante Rojo No.40 a 485nm y 496nm

Concentración	Absorbancia a 485nm	% recuperación	Absorbancia a 496nm	% recuperación
1.00403E-07	0.208	104%	0.232	101%
2.00806E-07	0.372	95%	0.414	94%
3.0121E-07	0.586	101%	0.629	96%
4.01613E-07	0.772	100%	0.831	96%
5.02016E-07	0.923	96%	0.995	93%
1.0121E-07	0.214	107%	0.243	106%
2.02419E-07	0.377	97%	0.438	99%
3.03629E-07	0.628	109%	0.700	108%
4.04839E-07	0.799	104%	0.865	101%
5.06048E-07	0.937	98%	1.024	96%
1.01613E-07	0.201	106%	0.231	107%
2.03226E-07	0.403	108%	0.461	109%
3.04839E-07	0.549	98%	0.614	98%
4.06452E-07	0.689	93%	0.766	92%
5.08065E-07	0.996	107%	1.057	102%
1.02016E-07	0.209	105%	0.247	109%
2.04032E-07	0.424	108%	0.478	108%
3.06048E-07	0.619	106%	0.674	102%
4.08065E-07	0.803	103%	0.870	100%
5.10081E-07	0.957	99%	1.023	94%
1.00806E-07	0.218	109%	0.236	102%
2.01613E-07	0.384	98%	0.410	92%
3.02419E-07	0.537	92%	0.601	91%
4.03226E-07	0.727	94%	0.791	91%
5.04032E-07	0.919	95%	1.04	96%
1.02016E-07	0.159	94%	0.193	96%
2.04032E-07	0.382	105%	0.417	101%
3.06048E-07	0.500	91%	0.567	91%
4.08065E-07	0.684	92%	0.768	91%
5.10081E-07	0.886	95%	0.963	91%

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.18: Promedios de porcentajes de recuperación

Promedios Amarillo No.6		
Concentración	% recuperación a 485nm	% recuperación a 496nm
1	101.68%	104.35%
2	100.86%	101.44%
3	94.27%	94.44%
4	95.88%	98.10%
5	94.86%	95.62%
Promedio	97.51%	98.79%

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Promedios Rojo No.40		
Concentración	% recuperación a 485nm	% recuperación a 496nm
1	104.14%	103.51%
2	101.90%	100.51%
3	99.53%	97.69%
4	97.83%	95.05%
5	98.45%	95.19%
Promedio	100.37%	98.39%

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

8.5 Identificación y Cuantificación de colorantes en mermeladas de fresa

Para la identificación de los colorantes se tomaron en cuenta las manchas reportadas en la cromatografía, así como también los valores de Rf comparándolos con los valores de los estándares de colorantes Amarillo No. 6 y Rojo No. 40. Determinando de esta manera un resultado “Positivo” para indicar su presencia en la mermelada de fresa y “negativo” indicando que la mermelada carece del colorante indicado. Los cálculos de los valores de Rf se pueden observar en anexos en el cuadro No.33.

Cuadro No. 19: Identificación de colorantes artificiales (Amarillo No. 6 y Rojo No. 40) en mermeladas de fresa.

Marca	Lote/ Muestra	Colorante artificial a identificar / Resultado	
		Amarillo No.6	Rojo No.40
A	1-1	Negativo	Positivo
	1-2	Negativo	Positivo
	2-1	Negativo	Positivo
	2-2	Negativo	Positivo
	3-1	Negativo	Positivo
	3-2	Negativo	Positivo
B	1-1	Positivo	Positivo
	1-2	Positivo	Positivo
	2-1	Positivo	Positivo
	2-2	Positivo	Positivo
	3-1	Positivo	Positivo
	3-2	Positivo	Positivo
C	1-1	Negativo	Negativo
	1-2	Negativo	Negativo
	2-1	Negativo	Negativo
	2-2	Negativo	Negativo
	3-1	Negativo	Negativo
	3-2	Negativo	Negativo

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Posteriormente se cuantificaron los colorantes que dieron “Positivo” en la identificación, utilizando únicamente las dos marcas que reportaron colorante, es por ello que en los cuadros no aparece la marca C. En los cuadros No. 20 al No.22 se puede observar lo que se obtuvo de absorbancia para cada muestra y a su vez lo que corresponde a su cuantificación en mg/kg. Siendo

los límites de colorante permitido 300mg/kg para Amarillo Ocaso (Amarillo No.6) y 500mg/kg para Rojo Allura (Rojo No. 40). De manera que la letra A o B indica la marca, la numeración 1, 2 ó 3 indica el lote habiendo dos muestras para cada lote.

Cuadro No.20: Cuantificación de colorantes (Amarillo No.6 y Rojo No. 40) en mermeladas de fresa. Repetición 1.¹

Muestra	Peso g	absorbancia a 485nm	absorbancia a 496nm	Cuantificación mg/kg
A1-1	5.0083		0.366	17.389
A1-2	5.1147		0.304	14.122
A2-1	5.0054		0.302	14.335
A2-2	5.1287		0.400	18.570
A3-1	5.0412		0.309	14.566
A3-2	5.0108		0.317	15.037
B1-1	5.0425	0.452	0.443	20.009
B1-2	5.0184	0.526	0.515	23.363
B2-1	5.037	0.440	0.431	19.484
B2-2	5.0055	0.454	0.448	20.441
B3-1	5.0238	0.450	0.441	19.992
B3-2	5.0331	0.462	0.455	20.630

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.21: Cuantificación de colorantes (Amarillo No.6 y Rojo No. 40) en mermeladas de fresa. Repetición 2.¹

Muestra	Peso g	absorbancia a 485nm	absorbancia a 496nm	Cuantificación mg/kg
A1-1	5.0100		0.327	15.518
A1-2	5.0858		0.317	14.815
A2-1	5.0909		0.384	17.954
A2-2	5.0783		0.350	16.394
A3-1	5.0503		0.358	16.865
A3-2	5.0327		0.320	15.114
B1-1	5.0608	0.398	0.391	17.613
B1-2	5.0089	0.425	0.425	19.482
B2-1	5.0094	0.380	0.377	17.225
B2-2	5.0008	0.471	0.460	20.920
B3-1	5.0173	0.424	0.416	18.892
B3-2	5.0874	0.480	0.467	20.844

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

¹El procedimiento desde el pesado hasta la cuantificación se llevó a cabo por triplicado en cada muestra de mermelada de fresa. Es por ello que se observa repetición 1,2 ó 3.

Cuadro No.22: Cuantificación de colorantes (Amarillo No.6 y Rojo No. 40) en mermeladas de fresa. Repetición 3.¹

Muestra	Peso g	absorbancia a 485nm	absorbancia a 496nm	Cuantificación mg/kg
A1-1	5.0001		0.332	15.788
A1-2	5.0663		0.336	15.771
A2-1	5.0465		0.311	14.646
A2-2	5.0648		0.322	15.113
A3-1	5.022		0.393	18.630
A3-2	5.032		0.351	16.593
B1-1	5.0134	0.503	0.487	22.013
B1-2	5.0404	0.502	0.499	22.677
B2-1	5.0451	0.435	0.434	19.734
B2-2	5.0218	0.495	0.493	22.505
B3-1	5.0929	0.486	0.481	21.596
B3-2	5.0504	0.494	0.478	21.442

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.23: Promedios de cuantificación.

Muestra	Promedios	
	Cuantificación mg/kg	Cumple/No cumple Límite 500mg/kg. ²
A1-1	16.232	Cumple
A1-2	14.903	Cumple
A2-1	15.645	Cumple
A2-2	16.692	Cumple
A3-1	16.687	Cumple
A3-2	15.581	Cumple
B1-1	19.878	Cumple
B1-2	21.841	Cumple
B2-1	18.814	Cumple
B2-2	21.288	Cumple
B3-1	20.160	Cumple
B3-2	20.972	Cumple

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

¹El procedimiento desde el pesado hasta la cuantificación se llevó a cabo por triplicado en cada muestra de mermelada de fresa. Es por ello que se observa repetición 1,2 ó 3.

²Se colocó el límite del colorante rojo el cual corresponde a 500mg/kg debido a que todas las muestras lo presentan, sin embargo, todas las muestras cumplen también con el límite del colorante amarillo el cual corresponde a 300mg/kg.

Finalmente se analizaron las etiquetas de cada marca de mermelada de fresa y se comparó con las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano -Etiquetado General de los alimentos previamente envasados- RTCA 67.01.07:10. Determinando así el cumplimiento con el reglamento.

Cuadro No. 24: Etiquetado Obligatorio de los alimentos preenvasados Cumple/No cumple.

	Marcas		
	A	B	C
Nombre del alimento	Cumple	Cumple	Cumple
Lista de ingredientes	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido neto	Cumple	Cumple	Cumple
Registro Sanitario	Cumple	Cumple	Cumple
Nombre y dirección	Cumple	Cumple	Cumple
País de origen	Cumple	Cumple	Cumple
Lote	Cumple	Cumple	Cumple
Fecha de vencimiento	Cumple	Cumple	Cumple
Instrucciones para el uso	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de determinar las longitudes de onda a las que se iba a trabajar cada colorante, se verificó la longitud de onda máxima del estándar de rojo No.40 o conocido también como Rojo Allura y del amarillo No.6 o Amarillo Ocaso. Longitudes que se pueden observar en el cuadro No.5 de los resultados, siendo la longitud de onda máxima del amarillo 485nm y la del rojo 496nm.

La validación del método se inició con el parámetro de linealidad. En el cuadro No.6 se puede observar las ecuaciones de la curva tanto a 485nm como a 496nm para ambos colorantes, así como también se puede observar que los coeficientes de determinación se encuentran por encima de 0.9998, siendo el valor mínimo aceptable de 0.9996, indicando de esta manera que el método es lineal y por lo tanto se pueden obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en una muestra. Todas las curvas realizadas para ambos colorantes se pueden observar en las gráficas No.1 a la No.4 en Anexos.

El parámetro de precisión se evaluó con las muestras de mermeladas, para ello se analizaron los tres lotes de cada marca y se tomaron en cuenta los resultados de las tres repeticiones realizadas. Como se puede observar en el cuadro No.7, se muestra la marca, el lote, los pesos de las muestras de mermeladas junto a las absorbancias obtenidas, los promedios, la desviación estándar y el coeficiente de variación. En este caso el cuadro muestra los resultados para el colorante rojo No.40 en la marca A. En donde se observa que la desviación estándar obtenida en general fue pequeña y el coeficiente de variación oscila entre 1.47% - 2.62% siendo un porcentaje aceptable ya que se encuentra debajo del límite establecido para alimentos según el Codex Alimentarius, al mencionar que para concentraciones entre 0.1 g/kg – 1 g/kg el porcentaje de variación aceptado oscila entre 6-8% (FAO/WHO Food Standards Programme, 2013). En el cuadro No.8 se observa la precisión para el colorante rojo No.40 en la marca B, en donde se observa un comportamiento similar, no superando un 2.29% de coeficiente de variación. Finalmente, el cuadro No.9 muestra los resultados de precisión para el colorante amarillo No.6 en la marca B, teniendo un comportamiento igual ya que presentó coeficientes de variación entre 1.18%-2.17%. Estos resultados indican que a pesar de que la matriz de la muestra presenta diferentes componentes, el método logra cuantificar de manera precisa los colorantes que están en estudio, dando así resultados que siguen un patrón que se mantiene y que concuerdan entre sí.

En cuanto al parámetro de robustez, éste se evaluó tomando en cuenta dos puntos importantes; la longitud de onda y el pH. En los cuadros No. 10 al No. 12 se observa que se varió la longitud de onda a la que se leía la muestra, se puede observar la absorbancia de cada muestra a 3nm por debajo de la longitud máxima elegida y 3nm por encima. Todas las muestras se comportaron de la misma manera y se observó una mínima variación en la absorbancia que va desde un 0.001 a 0.005 como máximo para el colorante amarillo No.6 y una variación desde un 0.001 a 0.007 como máximo para el colorante rojo No.40. Por lo tanto, es un cambio que no interfiere en gran medida con la cuantificación y le da una robustez aceptable al método.

El parámetro de robustez también se evaluó al modificar el pH de *“la solución coloreada final”* obtenida para cada muestra de mermelada. En los cuadros No.13 al No.15 se observan dichos resultados. Al centro del cuadro se indica el pH normal de la muestra y la absorbancia obtenida, se registra también la absorbancia obtenida al disminuir 0.2 el pH inicial y la absorbancia obtenida al incrementar 0.2 el pH inicial. En general se observó que hubo un mayor cambio en la absorbancia al disminuir el pH que al incrementarlo. Es importante destacar que el pH se disminuyó con la ayuda de ácido acético y se elevó con la ayuda de hidróxido de amonio. Se utilizaron estos reactivos ya que son los reactivos que intervienen en el proceso de extracción del colorante con la lana, por lo que no se incorporó un reactivo que no se haya tomado en cuenta inicialmente. En cuanto a los resultados obtenidos, se puede observar que hubo una variabilidad mayor en las absorbancias al disminuir el pH, obteniendo un promedio aproximado de 0.007 que se incrementaba al valor normal de absorbancia de la muestra, mientras que al elevar el pH no se observa mayor cambio siendo el promedio de 0.002 el valor que se incrementaba al valor normal de absorbancia. Los cambios no son drásticos, pero para tener resultados más precisos es importante que la metodología se maneje siempre al pH básico en el que se encuentra la muestra al terminar su tratamiento y no adicionar ningún otro reactivo que pueda interferir con el pH.

Para el parámetro de exactitud se llevaron a cabo 6 soluciones madre a partir de los estándares de cada uno de los colorantes a evaluar y se realizaron 6 curvas de calibración con 5 concentraciones diferentes. Cada curva se leyó en el UV-VIS para obtener su absorbancia a las longitudes de onda máxima. La base de datos completa se puede observar en Anexos en los cuadros No.27 y No.28. Posteriormente, las mismas soluciones se pusieron a prueba junto a la lana de oveja desengrasada para que ésta absorbiera el colorante con la ayuda del ácido acético y luego se extrajera con la

ayuda de hidróxido de amonio para observar el porcentaje de recuperación del método. En el cuadro No.16 y No.17 en los resultados se pueden observar las absorbancias obtenidas tras dicho tratamiento, junto a su porcentaje de recuperación. Los valores oscilan entre un rango de 90%-110% para ambos colorantes. En el cuadro No.18 se observan los promedios reportados para cada colorante a diferente longitud de onda máxima. Para el amarillo No.6 se obtuvo un 97.51% a 485nm y 98.79% a 496nm. El colorante rojo No.40 obtuvo porcentajes un poco más altos; siendo un 100.37% a 485nm y 98.39% a 496nm. Sin embargo, ambos colorantes tuvieron promedios cercanos a un 100% siendo estos aceptables.

Durante el proceso de validación se observó que las absorbancias de las dos concentraciones más bajas de la curva de calibración obtenían porcentajes de recobro bastante altos, llegando hasta un 150%, mientras que en las siguientes tres concentraciones más altas de la curva se observaban porcentajes altos pero aceptables. Por lo que después de realizar varias modificaciones en el método, se logró bajar esos porcentajes, al incorporar la etapa de centrifugación y filtrado a la solución final obtenida de la extracción del colorante. Lo que estaba sucediendo era que las muestras presentaban restos de lana en solución y esto provocaba que la absorbancia variara en gran cantidad y las concentraciones más afectadas eran las más diluidas. Por lo tanto, se agregó la operación de centrifugación por 10 minutos a 1000rpm, lo que permitió que los restos de lana quedaran como sedimento y la solución estuviera libre de partículas. Posteriormente, la solución se filtró al vacío para disminuir la pérdida de colorante a través del papel filtro y así mismo tener una solución más cristalina, la cual finalmente dio mejores resultados al someterse a la lectura de la absorbancia y es por ello que se pudieron obtener muy buenos promedios de porcentajes de recuperación.

Para determinar qué fase móvil utilizar para la identificación de los colorantes en las mermeladas, se llevaron a cabo varias pruebas utilizando diferentes reactivos o en distintas proporciones con el fin de determinar la fase móvil que separaba de mejor manera a los estándares de los colorantes y las muestras; las pruebas que se realizaron inicialmente sobre papel filtro y luego sobre la sílica gel, se pueden observar en la figura No.5 en Anexos. Determinando finalmente que la mejor fase móvil estaba conformada por: n-butanol, etanol, hidróxido de amonio y agua desmineralizada; en proporciones de 25mL, 13mL, 5mL y 7mL respectivamente. Sin embargo, debido a que las moléculas de los colorantes son similares, estos fueron arrastrados a puntos cercanos en la fase

estacionaria (sílica gel). Por lo tanto, dieron valores de Rf similares, como se puede observar en el cuadro No.33 en Anexos, el Rf del estándar del colorante amarillo No.6 fue de 0.53 y el Rf del estándar del colorante rojo No.40 fue de 0.55. Las muestras correspondientes de la marca A reportaron valores de Rf de 0.55 y 0.56 verificando de esta manera la presencia del colorante Rojo Allura tal y como lo menciona su respectiva etiqueta. Las muestras correspondientes de la marca B reportaron valores de Rf de 0.52 y 0.53, lo cual indica la presencia del colorante amarillo No.6. Sin embargo, al comparar las manchas entre marcas se observó que las manchas de las muestras de B son más fuertes aparentando una doble banda, como se puede apreciar en la Imagen No. 6 en Anexos, pero para cálculos del Rf se tomó como una sola banda. Es muy probable que esto se deba a que en la etiqueta mencionan la presencia del colorante amarillo No.6 y del colorante rojo No.40, pero por la cercanía de los valores de Rf las bandas no se lograron separar adecuadamente. Por lo tanto, la cuantificación se llevó a cabo tomando en cuenta la presencia de ambos colorantes. En cuanto a la marca C, ésta presentó valores de Rf de 0 ya que no se observó ninguna mancha, concluyendo que esta marca no presenta colorantes artificiales tal y como lo indica su etiqueta. En el cuadro No.19 en los resultados se puede observar con mayor claridad el resultado positivo o negativo para cada muestra de mermelada.

Posteriormente, procediendo a la cuantificación de los colorantes en las mermeladas, el procedimiento que se realizó fue igual al previamente validado, utilizando en este caso aproximadamente 5g de muestra de mermelada, llevándola a un volumen definido en un balón aforado, filtrándola y procediendo a la extracción del colorante a través de la lana de oveja tal y como se indica en la metodología. Los resultados de cuantificación se pueden observar en los cuadros No. 20 al No. 22, en donde se observa tanto la absorbancia obtenida como el equivalente a mg/kg de esa absorbancia tras realizar los cálculos correspondientes aplicando la Ley de Lambert-beer para mezcla de colorantes. Las muestras de la marca A contienen únicamente Rojo Allura o rojo No.40, por lo tanto, es el único colorante que se observa cuantificado. Las muestras de la marca B presentan ambos colorantes por lo tanto se observa la absorbancia obtenida a las dos longitudes de onda máxima con las que se estaba trabajando y el equivalente a mg/kg incluye la cuantificación de ambos colorantes. Finalmente se observa en el cuadro No.23 los promedios de la cuantificación y el resultado de su cumplimiento. Se indica en el cuadro el límite de 500mg/kg, el cual corresponde al límite para el colorante rojo No.40, ya que el límite para el colorante

amarillo No.6 es de 300mg/kg en mermeladas pero el colorante rojo No.40 es el que ambas marcas presentaron. Sin embargo, el promedio más alto reportado de colorante fue para la marca B, lote 1, muestra 2; siendo el valor de 21.841 mg/kg, valor que se encuentra bastante alejado de los límites establecidos. Por lo tanto, todas las muestras de mermelada de fresa cumplieron con el límite establecido según el Reglamento Técnico Centroamericano -Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios- RTCA 67.04.54:10.

Asimismo, se llevó a cabo el análisis de la etiqueta de cada marca, con el motivo de verificar su cumplimiento con lo determinando en el Reglamento Técnico Centroamericano -Etiquetado General de los alimentos previamente envasados- RTCA 67.01.07:10. Como se observa en el cuadro No.24 de los resultados, todas las marcas cumplieron con dicho reglamento al indicar en su etiqueta los datos obligatorios, como lo son la lista de ingredientes, contenido neto, registro sanitario, nombre y dirección, país de origen, lote, fecha de vencimiento y las instrucciones para el uso.

10. CONCLUSIONES

1. La metodología utilizada para la cuantificación de los colorantes demostró ser lineal al tener coeficientes de correlación de 0.9998 y 0.9999.
2. La precisión del método es aceptable al mantener desviaciones estándar pequeñas y valores de coeficientes de variación menores a un 3%, siendo el valor teórico aceptable entre 6-8% según lo establecido por el Codex Alimentarius.
3. Las soluciones finales de las muestras listas para cuantificar se deben trabajar al pH básico en el que se encuentran ya que se observó que al modificar el pH hay una pequeña variabilidad en la absorbancia que podría modificar a los resultados obtenidos.
4. El método es robusto en cuanto al incremento de hasta 3nm y la disminución de hasta 3nm en la longitud de onda máxima establecida para llevar a cabo las lecturas en el espectrofotómetro UV-VIS.
5. Luego de poner a prueba diferentes fases móviles se concluyó que la mejor para identificar a los colorantes amarillo No.6 y rojo No.40 en mermeladas de fresa fue la fase móvil compuesta por n-butanol, etanol, hidróxido de amonio y agua desmineralizada; en proporciones de 25mL, 13mL, 5mL y 7mL respectivamente.
6. Para obtener porcentajes de recuperación altos se incluyó al método la etapa de centrifugación por 10minutos a 1000rpm de la solución coloreada y el filtrado al vacío para obtener soluciones cristalinas y libres de partículas.
7. La marca de mermelada de fresa C no presentó colorantes artificiales, cumpliendo de esta manera con lo indicado en su etiqueta.
8. Tanto la marca de mermelada de fresa A como la B cumplieron con los límites establecidos para colorantes amarillo No.6 y rojo No.40 según el Reglamento Técnico Centroamericano -Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios- RTCA 67.04.54:10.
9. Las tres marcas de mermeladas cumplieron con los datos obligatorios de la etiqueta según lo determinando en el Reglamento Técnico Centroamericano -Etiquetado General de los alimentos previamente envasados- RTCA 67.01.07:10.

11. RECOMENDACIONES

1. Un material de gran importancia utilizado en la metodología de cuantificación es la lana de oveja. Por lo tanto, esta debe tratarse adecuadamente; se debe realizar el lavado y el tratamiento con NaOH al 15%, etanol y agua destilada según se menciona en la metodología para obtener buenos resultados.
2. Es importante que se tome en cuenta las dos etapas incorporadas a la metodología, tanto la centrifugación para eliminar restos de lana y el filtrado al vacío para obtener una solución más cristalina y evitar al mismo tiempo la pérdida del colorante a través del papel filtro, ya que de esta manera se obtienen resultados más exactos y precisos.
3. Si tras tomar todas las medidas respectivas con el uso de la lana las soluciones finales se encuentran turbias, se puede llevar a cabo un segundo tratamiento a la lana antes de utilizarla, de manera que se introduzca por 15 segundos dentro de una solución de ácido acético al 33% y se exprima bien, luego se introduce por 15 segundos dentro de una solución de hidróxido de sodio al 33%, se vuelve a exprimir bien y posteriormente se introduce por 30 segundos en un beaker con agua destilada para eliminar restos de reactivos, exprimiéndola bien y dejándola secar unos minutos antes de utilizarla. Esto con el fin de realizarle un pequeño “remojo” a la lana en los reactivos y que ésta pueda sacar los restos de contaminantes que son los que provocan la turbidez en los resultados finales.
4. Cuando se desea cuantificar una mezcla de colorantes es importante tomar en cuenta las longitudes de onda máxima de cada colorante en estudio y tomar siempre las absorbancias emitidas por cada colorante a cada longitud máxima para que la cuantificación sea exacta y no exista errores en los cálculos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. (2013). *Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Appendix K*. AOAC Official Methods of Analysis.
- Badui, S. (s.f). *La Ciencia de los Alimentos en la Práctica*. Pearson.
- Biomodel. (s.f.). *Cromatografía*. Obtenido de Biomodel: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/TLC-ascen.opt.svg>
- Calvo, M. (2004). *Bioquímica de los alimentos*. Recuperado el 6 de marzo de 2017, de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/colorartif.html>
- CDER, C. d. (2016). *FDA Food & Drug Administration*. Obtenido de Formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata Cambios de escala y posteriores a la aprobación: documentación química, de fabricación y controles, de pruebas de disolución in vitro y bioequivalencia in vivo: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm202142.htm>
- Christian, G. (2009). *Química Analítica*. México: Mc-Graw-Hill.
- Colores Alimentarios en la salud*. (2012). Obtenido de www.itsteziutlan.edu.mx/site2010/pdfs/2012/11/articulo_colorantes_abril_2012.pdf
- FAO/WHO Food Standars Programme. (2013). *Codex Alimentarius*. Rome, Italy: FAO/WHO .
- FDA. (2010). *Validation of Analytical Procedures: Definition And Terminology*. U.S.: Food and Drug Administration.
- FDA. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. U.S.: Food and drug administration .
- Franco, C. (s.f.). *Apriscos San Miguel*. Obtenido de http://www.actiweb.es/ovinos/lana_de_oveja.html
- Grupo Latino Editores. (2008). *Ciencia, Tecnología e Industria de Alimentos*. Colombia: Grupo Latino Editores.
- Harris, D. (2013). *Análisis químico cuantitativo*. España: Reverte.
- Katz, D. (2009). The Extraction and Identification of artificial food colors.
- Kirk, R. S., Sawyer, R., & Egan, H. (2008). *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. México: Grupo Editorial Patria.
- Kobylewski, S. (2010). *Food Dyes A Rainbow of Risks*. California: Center for Science in the Public Interest.

- Lindsay, J. (1997). *Food Safety and Toxicity*. USA: CRC Press .
- OGA. (2007). *Política de Selección y Validación de Métodos de ensayo*. Guatemala: Oficina de Acreditación Guatemala.
- OMS. (1992). Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Informe 32. Anexo 5. "*Validación de los procedimientos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos*".
- Ponce, E. (2012). *Extracción de Colorantes Sintéticos*. Obtenido de sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/Practica_3_13o.pdf
- Potter, N., & Hotchkiss, J. (s.f). *Ciencia de los Alimentos*. España: Acribia.
- R. K., S. S., & S. S. (2016). Extraction, Analytical and Advanced Methods for Detection of Allura Red in Food and Beverages Products. *Frontier in Microbiology*, 1-13.
- Reglamento Técnico Centroamericano. *-Etiquetado General de los alimentos previamente envasados- (RTCA 67.01.07:10)*.
- Reglamento Técnico Centroamericano. *-Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos alimentarios- (RTCA 67.04.54:10)*. Anexo de la resolución No. 283-2012 (COMIECO-LXII).
- Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Prentice-Hall, Inc.
- Sánchez, J. (2013). La Química del color en los alimentos . *Química Viva*, 234-246 .
- Skoog, D., Holler , J., & Crouch, S. (2007). *Principios de Análisis Instrumental*. México: Brooks/Cole.
- Srinivasan, D., Kirk, P., & Owen, F. (2008). *Química de los alimentos Fennema*. España: Editorial Acribia.
- Teñido de fibras naturales con pigmentos*. (2009). Obtenido de <http://www.oocities.org/cucba/tincionartesanal.html>

13. ANEXOS

Cuadro No. 25: Base de Datos para curvas de calibración (Amarillo No.6)

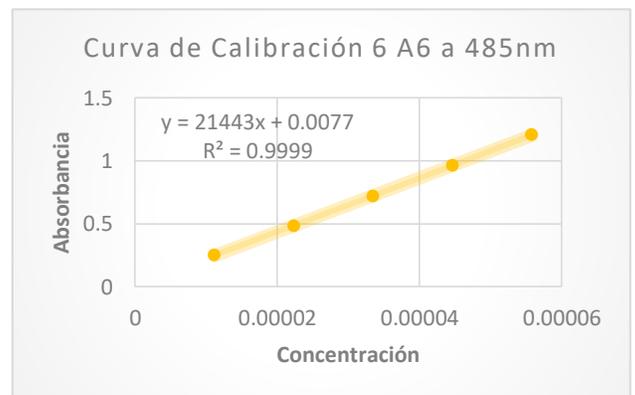
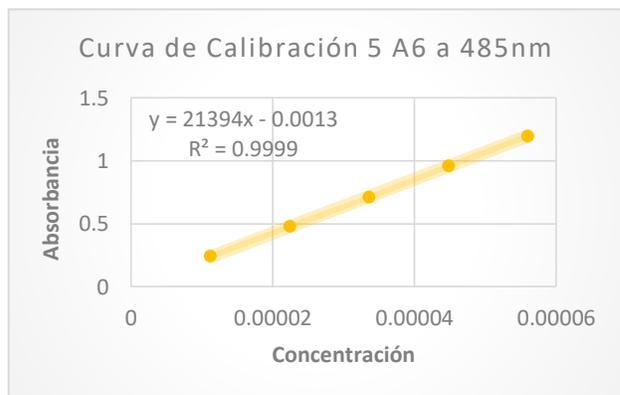
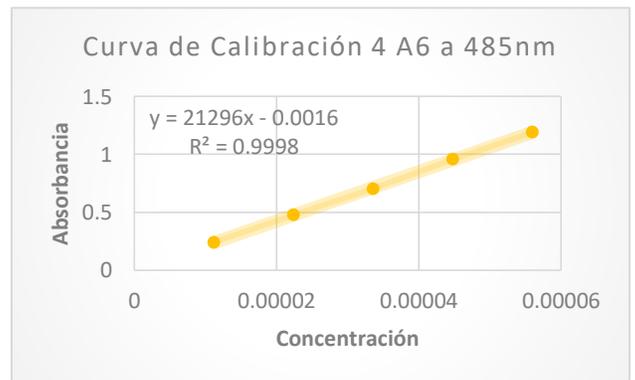
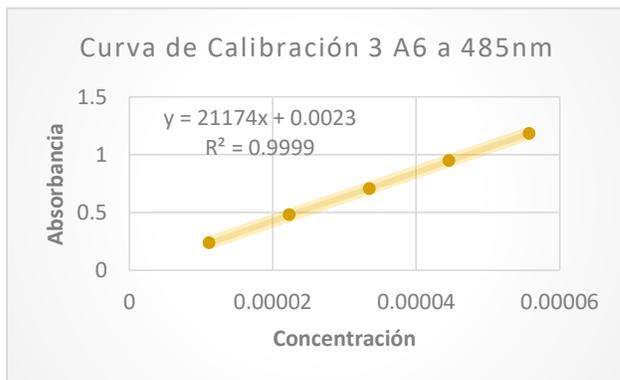
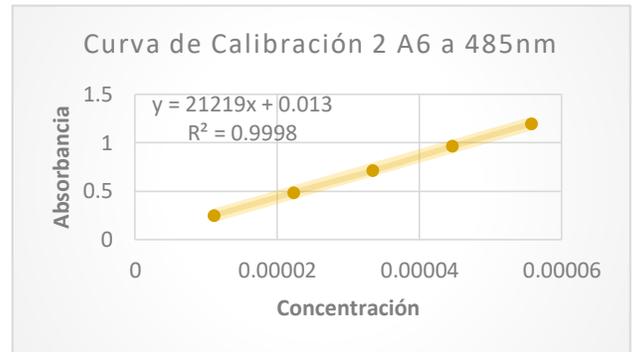
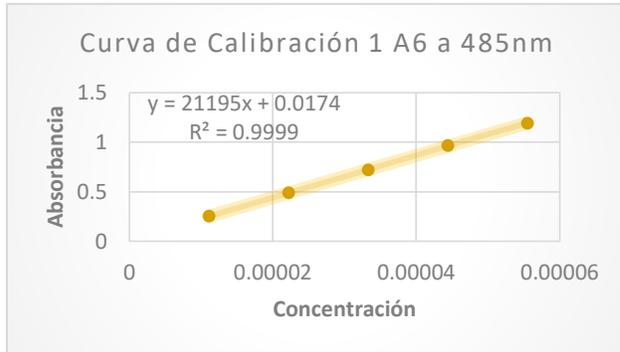
Solución madre	Solución hija	Absorbancia a 485nm	Absorbancia a 496nm	Peso g	Peso Molecular	Volumen dilución 1	litro	Molaridad Solución madre	Volumen dilución 2	Molaridad Soluciones hijas
Amarillo 6_1 0.0251g	1	0.252	0.241	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	1.11062E-05
	2	0.489	0.466	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	2.22124E-05
	3	0.721	0.686	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	3.33186E-05
	4	0.965	0.918	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	4.44248E-05
	5	1.191	1.132	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	5.5531E-05
Amarillo 6_2 0.0252g	1	0.252	0.240	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	1.11504E-05
	2	0.487	0.463	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	2.23009E-05
	3	0.714	0.679	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	3.34513E-05
	4	0.965	0.917	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	4.46018E-05
	5	1.196	1.138	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	5.57522E-05
Amarillo 6_3 0.0252g	1	0.237	0.224	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	1.11504E-05
	2	0.479	0.453	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	2.23009E-05
	3	0.706	0.668	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	3.34513E-05
	4	0.948	0.897	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	4.46018E-05
	5	1.183	1.121	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	5.57522E-05
Amarillo 6_4 0.0253g	1	0.239	0.226	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	1.11947E-05
	2	0.477	0.453	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	2.23894E-05
	3	0.704	0.668	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	3.35841E-05
	4	0.957	0.908	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	4.47788E-05
	5	1.191	1.129	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	5.59735E-05
Amarillo 6_5 0.0253g	1	0.241	0.228	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	1.11947E-05
	2	0.478	0.453	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	2.23894E-05
	3	0.710	0.673	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	3.35841E-05
	4	0.959	0.910	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	4.47788E-05
	5	1.198	1.135	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	5.59735E-05
Amarillo 6_6 0.0252g	1	0.25	0.238	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	1.11504E-05
	2	0.485	0.462	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	2.23009E-05
	3	0.721	0.686	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	3.34513E-05
	4	0.962	0.915	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	4.46018E-05
	5	1.207	1.147	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	5.57522E-05

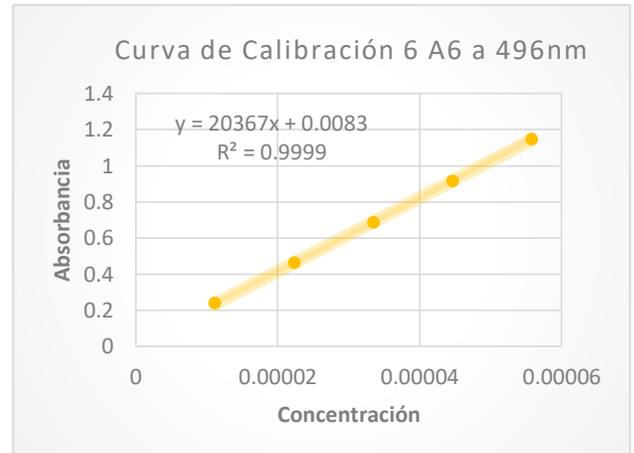
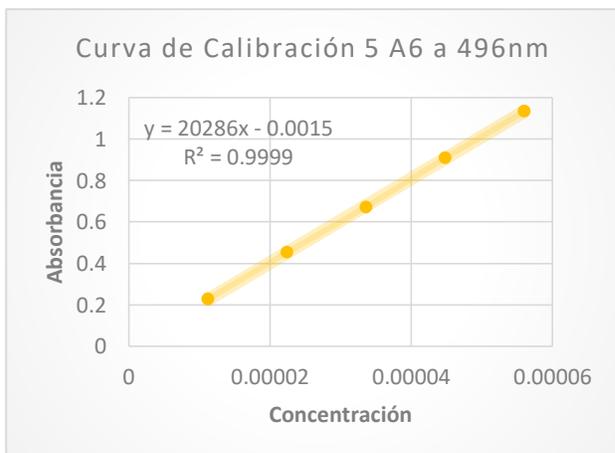
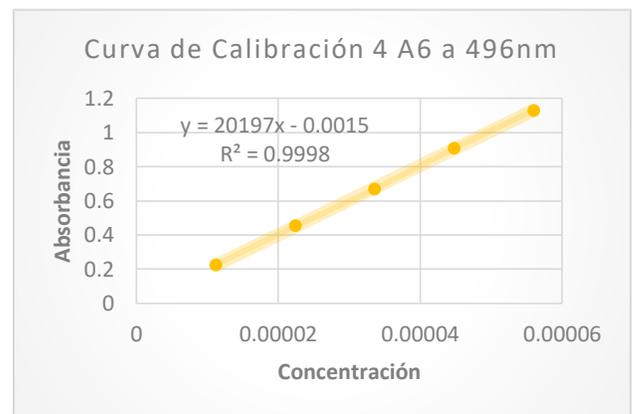
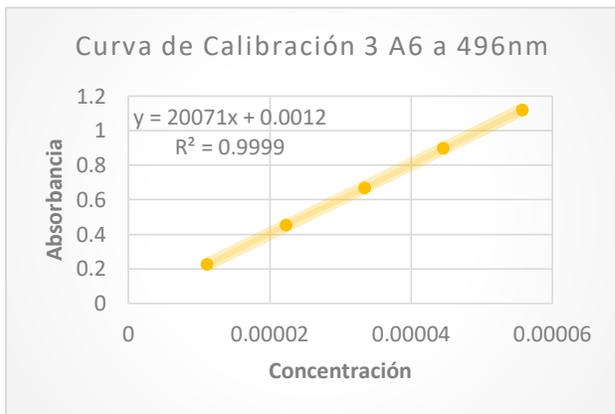
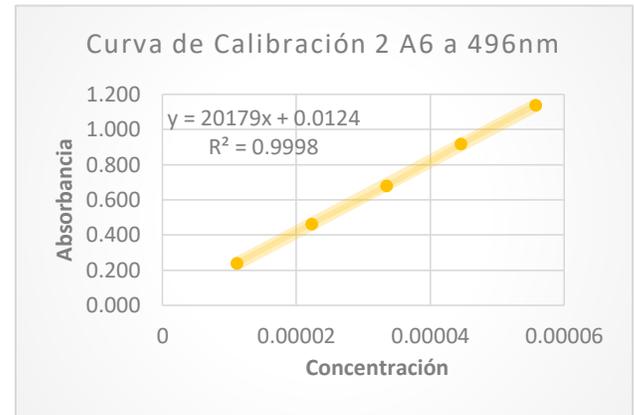
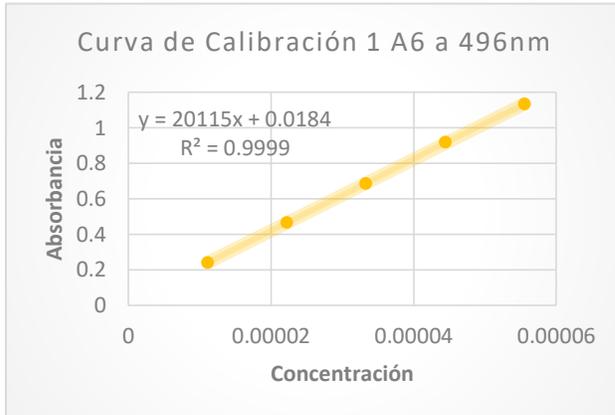
Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

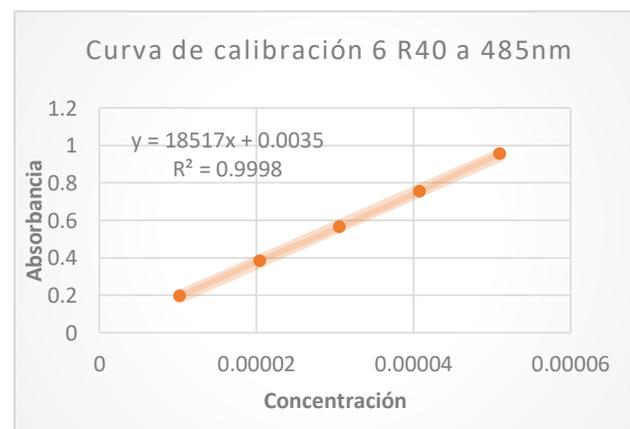
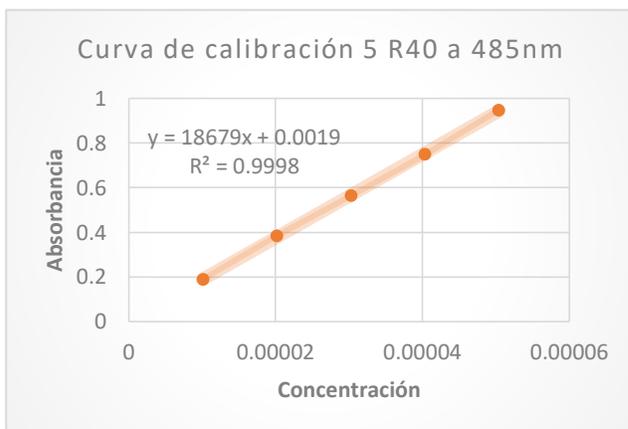
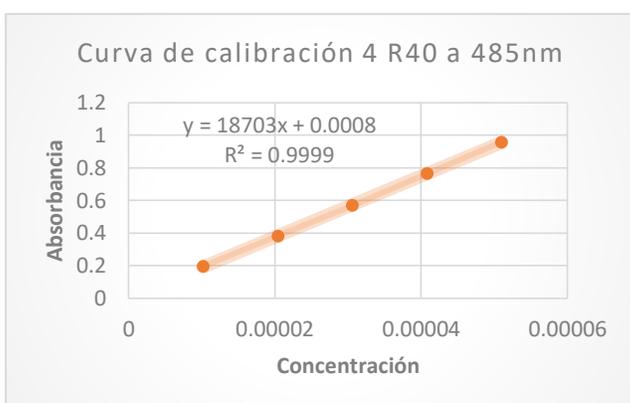
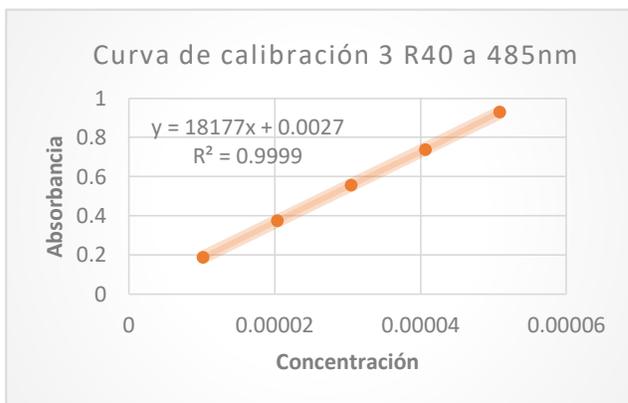
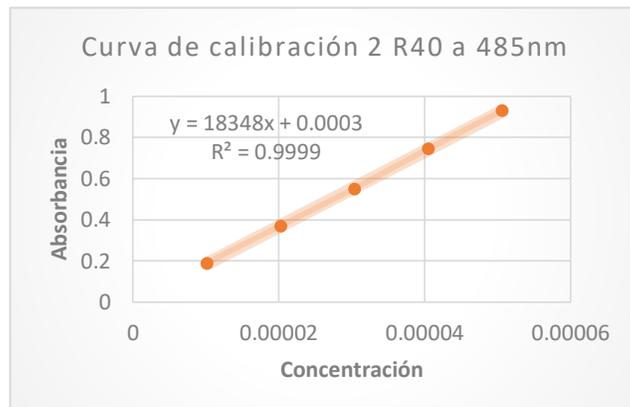
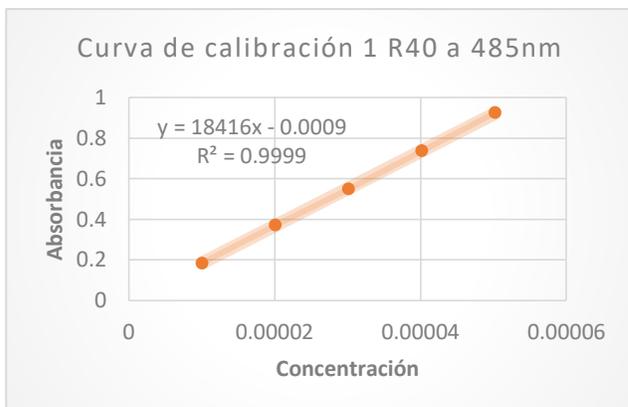
Cuadro No. 26: Base de Datos para curvas de calibración (Rojo No. 40)

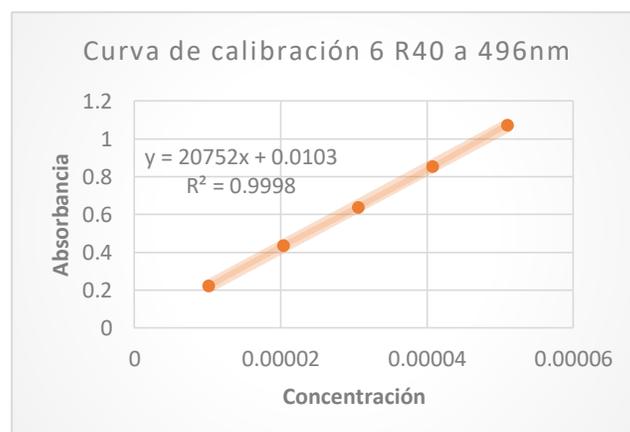
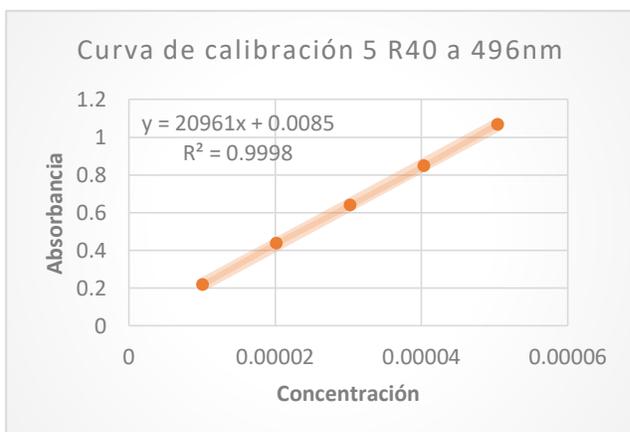
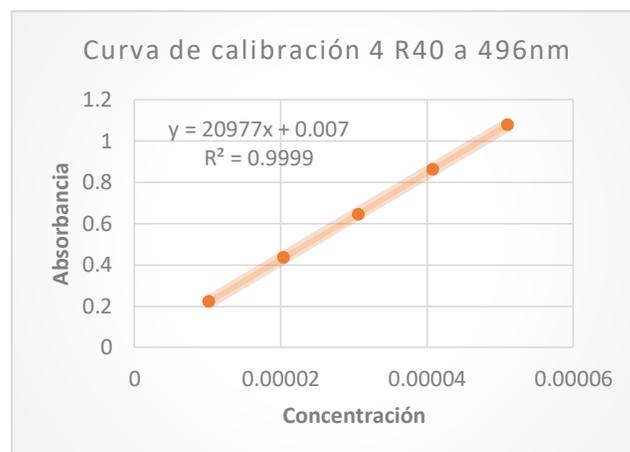
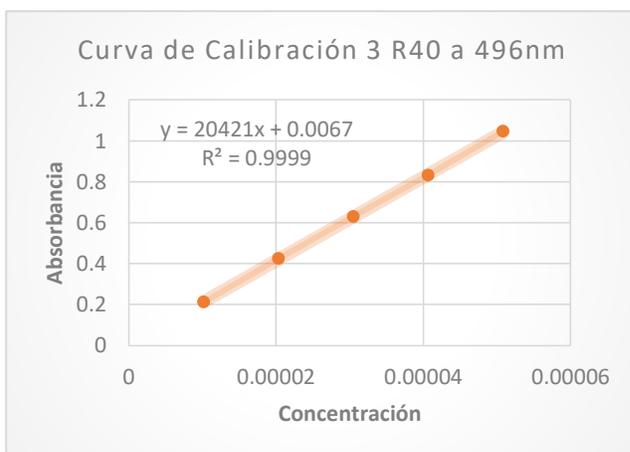
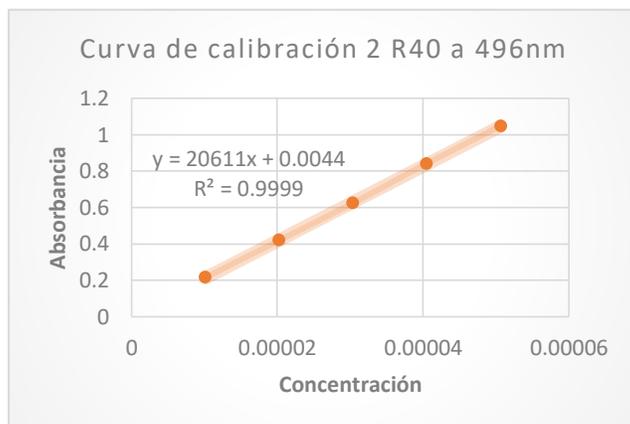
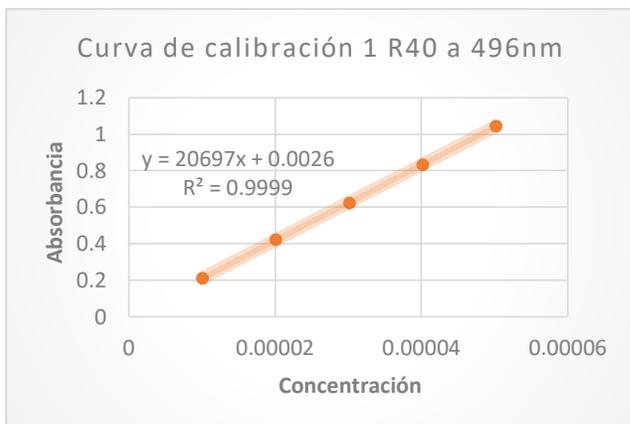
Solución madre	Solución hija	Absorbancia a 485nm	Absorbancia a 496nm	Peso	Peso Molecular	Volumen dilución 1	litro	Molaridad Solución madre	Volumen dilución 2	Molaridad Soluciones hijas
Rojo 40_1 0.0249g	1	0.185	0.21	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	1.00403E-05
	2	0.371	0.421	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	2.00806E-05
	3	0.549	0.623	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	3.0121E-05
	4	0.738	0.833	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	4.01613E-05
	5	0.926	1.043	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	5.02016E-05
Rojo 40_2 0.0251g	1	0.19	0.216	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	1.0121E-05
	2	0.37	0.420	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	2.02419E-05
	3	0.551	0.625	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	3.03629E-05
	4	0.745	0.842	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	4.04839E-05
	5	0.931	1.048	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	5.06048E-05
Rojo 40_3 0.0252g	1	0.187	0.212	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	1.01613E-05
	2	0.374	0.425	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	2.03226E-05
	3	0.557	0.631	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	3.04839E-05
	4	0.737	0.832	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	4.06452E-05
	5	0.929	1.046	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	5.08065E-05
Rojo 40_4 0.0253 g	1	0.194	0.222	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	1.02016E-05
	2	0.382	0.436	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	2.04032E-05
	3	0.569	0.645	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	3.06048E-05
	4	0.764	0.864	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	4.08065E-05
	5	0.957	1.078	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	5.10081E-05
Rojo 40_5 0.025 g	1	0.189	0.218	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	1.00806E-05
	2	0.384	0.437	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	2.01613E-05
	3	0.564	0.640	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	3.02419E-05
	4	0.749	0.848	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	4.03226E-05
	5	0.948	1.069	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	5.04032E-05
Rojo 40_6 0.0253 g	1	0.195	0.223	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	1.02016E-05
	2	0.384	0.438	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	2.04032E-05
	3	0.563	0.639	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	3.06048E-05
	4	0.755	0.853	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	4.08065E-05
	5	0.954	1.074	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	5.10081E-05

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Gráficas No. 1: Curvas de calibración del colorante Amarillo No.6 a longitud de 485nm

Gráficas No. 2: Curvas de calibración del colorante Amarillo No.6 a longitud de 496nm

Gráficas No. 3: Curvas de calibración del colorante Rojo No.40 a longitud de 485nm

Gráficas No. 4: Curvas de calibración del colorante Rojo No.40 a longitud de 496nm

Cuadro No. 27: Base de datos para porcentajes de recuperación (Amarillo No.6)

Solución madre	Solución hija	Absorbancia a 485nm	Absorbancia a 496nm	Peso	Peso Molecular	Volumen dilución 1	litro	Molaridad Solución madre	Volumen dilución 2	Molaridad Soluciones hijas
Amarillo 6_1 0.0251g	1	0.244	0.232	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	1.11062E-05
	2	0.477	0.454	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	2.22124E-05
	3	0.706	0.671	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	3.33186E-05
	4	0.955	0.908	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	4.44248E-05
	5	1.187	1.127	0.0251	452	100	1000	0.00055531	50	5.5531E-05
Amarillo 6_2 0.0252g	1	0.254	0.236	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	1.11504E-05
	2	0.503	0.470	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	2.23009E-05
	3	0.733	0.689	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	3.34513E-05
	4	0.972	0.924	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	4.46018E-05
	5	1.210	1.150	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	5.57522E-05
Amarillo 6_3 0.0252g	1	0.257	0.245	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	1.11504E-05
	2	0.486	0.464	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	2.23009E-05
	3	0.718	0.683	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	3.34513E-05
	4	0.965	0.917	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	4.46018E-05
	5	1.221	1.161	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	5.57522E-05
Amarillo 6_4 0.0253g	1	0.252	0.239	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	1.11947E-05
	2	0.483	0.46	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	2.23894E-05
	3	0.716	0.682	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	3.35841E-05
	4	0.961	0.914	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	4.47788E-05
	5	1.218	1.158	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	5.59735E-05
Amarillo 6_5 0.0253g	1	0.239	0.228	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	1.11947E-05
	2	0.489	0.465	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	2.23894E-05
	3	0.726	0.69	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	3.35841E-05
	4	0.961	0.911	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	4.47788E-05
	5	1.215	1.154	0.0253	452	100	1000	0.00055973	50	5.59735E-05
Amarillo 6_6 0.0252g	1	0.258	0.247	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	1.11504E-05
	2	0.494	0.47	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	2.23009E-05
	3	0.725	0.69	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	3.34513E-05
	4	0.976	0.928	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	4.46018E-05
	5	1.209	1.149	0.0252	452	100	1000	0.00055752	50	5.57522E-05

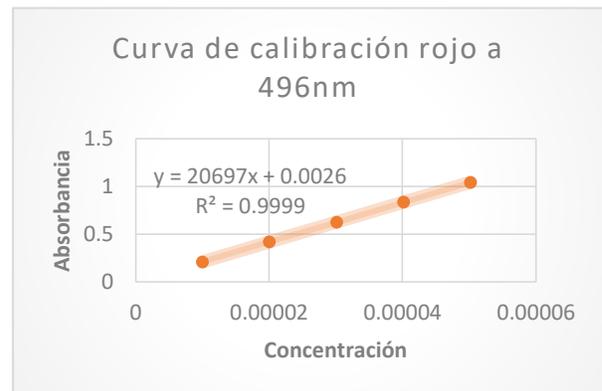
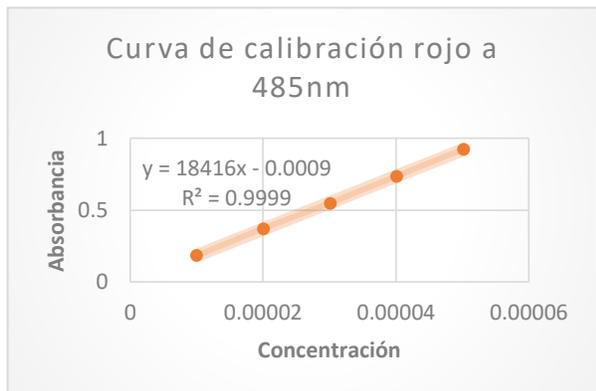
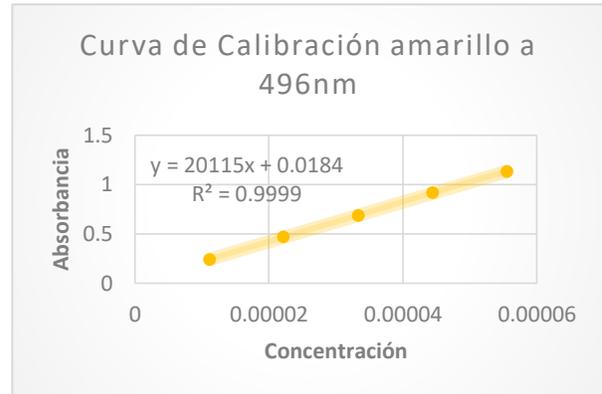
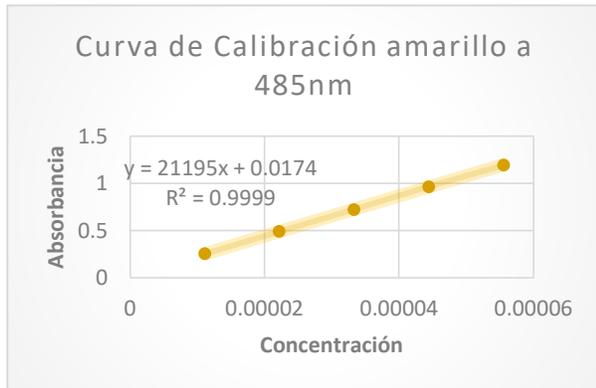
Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No. 28: Base de datos para porcentajes de recuperación (Rojo No.40)

Solución madre	Solución hija	Absorbancia a 485nm	Absorbancia a 496nm	Peso	Peso Molecular	Volumen dilución 1	litro	Molaridad Solución madre	Volumen dilución 2	Molaridad Soluciones hijas
Rojo 40_1 0.0249g	1	0.201	0.228	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	1.00403E-05
	2	0.391	0.442	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	2.00806E-05
	3	0.577	0.65	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	3.0121E-05
	4	0.772	0.869	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	4.01613E-05
	5	0.956	1.069	0.0249	496	100	1000	0.000502016	50	5.02016E-05
Rojo 40_2 0.0251g	1	0.200	0.228	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	1.0121E-05
	2	0.394	0.447	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	2.02419E-05
	3	0.574	0.648	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	3.03629E-05
	4	0.761	0.856	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	4.04839E-05
	5	0.958	1.073	0.0251	496	100	1000	0.000506048	50	5.06048E-05
Rojo 40_3 0.0252g	1	0.188	0.214	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	1.01613E-05
	2	0.379	0.429	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	2.03226E-05
	3	0.557	0.629	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	3.04839E-05
	4	0.735	0.828	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	4.06452E-05
	5	0.932	1.045	0.0252	496	100	1000	0.000508065	50	5.08065E-05
Rojo 40_4 0.0253 g	1	0.199	0.226	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	1.02016E-05
	2	0.395	0.448	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	2.04032E-05
	3	0.58	0.655	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	3.06048E-05
	4	0.78	0.878	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	4.08065E-05
	5	0.969	1.086	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	5.10081E-05
Rojo 40_5 0.025 g	1	0.203	0.231	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	1.00806E-05
	2	0.393	0.446	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	2.01613E-05
	3	0.579	0.654	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	3.02419E-05
	4	0.771	0.866	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	4.03226E-05
	5	0.969	1.085	0.025	496	100	1000	0.000504032	50	5.04032E-05
Rojo 40_6 0.0253 g	1	0.171	0.2	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	1.02016E-05
	2	0.363	0.417	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	2.04032E-05
	3	0.546	0.622	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	3.06048E-05
	4	0.75	0.847	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	4.08065E-05
	5	0.934	1.051	0.0253	496	100	1000	0.000510081	50	5.10081E-05

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Graficas No.5: Curvas de calibración que se utilizaron para cuantificar la mezcla de colorantes.



485nm		496nm
21195.3785	Pendiente	20114.9004
0.0174	intercepto	0.0184
0.99994984	correlación	0.9999443

485nm		496nm
18415.743	Pendiente	20696.5462
-0.0009	intercepto	0.0026
0.99994926	correlación	0.99997731

13.1 Cálculos para cuantificar mezcla de colorantes:

Debido a que hay una mezcla de colorantes (amarillo y rojo) se debe obtener cuatro ecuaciones de la recta junto a sus valores de pendientes. Estas deben corresponder a la pendiente del colorante amarillo a la longitud de onda máxima de dicho colorante, la pendiente del colorante amarillo a la longitud de onda máxima del colorante rojo. Así como también tener el dato de la pendiente del colorante rojo a la longitud de onda máxima de dicho colorante y la pendiente del colorante rojo a la longitud de onda máxima del colorante amarillo.

Ejemplo: En el cuadro se observan las pendientes correspondientes a las curvas de calibración que se observan en las gráficas No.5. Y están colocadas en el orden para su adecuada cuantificación.

Pendiente de amarillo a longitud máxima de amarillo + Pendiente de rojo a longitud máxima de amarillo = Absorbancia a 485nm
 Pendiente de amarillo a longitud máxima de rojo + Pendiente de rojo a longitud máxima de rojo = Absorbancia a 496nm

Ejemplo:

$$21195.3785x_1 + 18415.743x_2 = \text{Abs (a 485nm)}$$

$$20114.9004x_1 + 20696.5462x_2 = \text{Abs (a 496nm)}$$

En donde dice Abs (a 485nm) y Abs (a 496nm) se coloca el dato de absorbancia que dio la muestra leída a 485nm y leída a 496nm. Posteriormente se debe resolver el sistema de ecuaciones, en donde x_1 corresponderá para amarillo y x_2 para rojo. Al obtener los valores de numerador y denominador para cada incógnita ya se puede proseguir a la cuantificación como se observa más adelante en los cuadros No.29 al No.31.

Cuadro No.29: Base de datos para cuantificación de mezcla de colorantes en mermelada marca B.
Repetición 1.

	numerador	denominador	Concentración (moles/L)	Peso molecular (g/mol)	Volumen balón aforado L	mg colorante	mg colorantes totales	Peso de mermelada en Kg	Total colorantes mg/Kg
1									
B1-1	6.77E+15	3.859E+20	1.75361E-05	452	0.01	0.0792631	0.100895053	0.0050425	20.00893467
	9.01E+12	2.066E+18	4.36128E-06	496	0.01	0.02163196			
B1-2	1.06E+15	5.146E+19	2.05491E-05	452	0.01	0.09288208	0.117244365	0.0050184	23.36289747
	2.03E+12	4.132E+17	4.91175E-06	496	0.01	0.02436228			
B2-1	4.41E+14	2.573E+19	1.7135E-05	452	0.01	0.07745022	0.098139777	0.005037	19.48377553
	8.62E+12	2.066E+18	4.17128E-06	496	0.01	0.02068956			
B2-2	3.24E+15	1.93E+20	1.67933E-05	452	0.01	0.07590584	0.102316599	0.0050055	20.44083487
	2.75E+12	5.166E+17	5.32475E-06	496	0.01	0.02641075			
B3-1	5.39E+15	3.087E+20	1.74692E-05	452	0.01	0.07896095	0.10043584	0.0050238	19.99200614
	8.95E+12	2.066E+18	4.32962E-06	496	0.01	0.02147489			
B3-2	2.94E+13	1.694E+18	1.73306E-05	452	0.01	0.07833423	0.103832672	0.0050331	20.62996397
	3.03E+11	5.904E+16	5.14082E-06	496	0.01	0.02549845			

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.30: Base de datos para cuantificación de mezcla de colorantes en mermelada marca B.
Repetición 2.

	numerador	denominador	Concentración (moles/L)	Peso molecular (g/mol)	Volumen balón aforado L	mg colorante	mg colorantes totales	Peso de mermelada en Kg	Total colorantes mg/Kg
2									
B1-1	6.51E+14	4.288E+19	1.51915E-05	452	0.01	0.06866557	0.089137868	0.0050608	17.61339467
	2.84E+12	6.887E+17	4.12748E-06	496	0.01	0.0204723			
B1-2	2.81E+15	1.976E+20	1.42049E-05	452	0.01	0.06420594	0.097582682	0.0050089	19.48185876
	5.56E+11	8.265E+16	6.72918E-06	496	0.01	0.03337674			
B2-1	4.45E+15	3.293E+20	1.35104E-05	452	0.01	0.06106706	0.086288065	0.0050094	17.22522959
	1.05E+13	2.066E+18	5.08488E-06	496	0.01	0.025221			
B2-2	2.89E+15	1.544E+20	1.87109E-05	452	0.01	0.08457308	0.104616018	0.0050008	20.91985633
	8.35E+11	2.066E+17	4.04092E-06	496	0.01	0.02004294			
B3-1	2.1E+15	1.286E+20	1.63304E-05	452	0.01	0.07381326	0.094786854	0.0050173	18.89200449
	1.82E+11	4.305E+16	4.22855E-06	496	0.01	0.0209736			
B3-2	2.68E+15	1.372E+20	1.95514E-05	452	0.01	0.08837233	0.106040919	0.0050874	20.84383356
	7.36E+12	2.066E+18	3.56222E-06	496	0.01	0.01766859			

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC.

Cuadro No.31: Base de datos para cuantificación de mezcla de colorantes en mermelada marca B.
Repetición 3.

	numerador	denominador	Concentración (moles/L)	Peso molecular (g/mol)	Volumen balón aforado L	mg colorante	mg colorantes totales	Peso de mermelada en Kg	Total colorantes mg/Kg
3									
B1-1	5.44E+15	2.573E+20	2.11297E-05	452	0.01	0.0955064	0.110359531	0.0050134	22.01291156
	2.06E+12	6.887E+17	2.99458E-06	496	0.01	0.01485313			
B1-2	3.39E+15	1.93E+20	1.7588E-05	452	0.01	0.07949794	0.114300035	0.0050404	22.67677865
	1.45E+13	2.066E+18	7.01655E-06	496	0.01	0.03480209			
B2-1	4.57E+15	3.087E+20	1.4809E-05	452	0.01	0.06693647	0.099557968	0.0050451	19.7335965
	3.4E+12	5.166E+17	6.57692E-06	496	0.01	0.0326215			
B2-2	5.27E+15	3.087E+20	1.70842E-05	452	0.01	0.07722063	0.113013569	0.0050218	22.5045937
	1.49E+13	2.066E+18	7.21632E-06	496	0.01	0.03579294			
B3-1	3.39E+15	1.93E+20	1.7593E-05	452	0.01	0.07952037	0.109984779	0.0050929	21.59570748
	1.27E+13	2.066E+18	6.14202E-06	496	0.01	0.0304644			
B3-2	8.04E+15	3.859E+20	2.08289E-05	452	0.01	0.09414675	0.108293074	0.0050504	21.44247465
	2.95E+12	1.033E+18	2.85208E-06	496	0.01	0.01414633			

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC

Numerador / denominador = concentración moles/Litro
 por peso molecular (452 ó 496) por aforo final (0.01L) por mg (1000)
 dividido (1mol*1g) = mg de colorante
 dividido dentro del peso de mermelada (0.005kg) = **mg/kg colorante**

Cuadro No. 32: Datos generales del proceso de validación de identificación y cuantificación de colorantes en mermeladas.

Característica	Datos definidos
Marca	-
Lote/No. Muestra	-
Fecha Vencimiento	-
Peso g	5g
Min reposo	20min
mL agua agregada	25mL
mL muestra para tratar	25mL
peso promedio lana	0.5-1.0g
gotas ácido acético	20
tiempo calentamiento	20min
gotas hidróxido de amonio	20
tiempo de calentamiento	15min
velocidad de centrifuga	1000rpm
tiempo de centrifugación	10min
fase estacionaria	Sílica Gel
fase móvil	n-butanol etanol/NH ₄ OH/ agua
tiempo de saturación	1 hora
cantidad de estándar y muestra	3 repeticiones de 10uL de estándar y 6 repeticiones de 10uL de muestra
tiempo de elución	1 hora
absorbancia de mx a 485nm	-
absorbancia de mx a 496nm	-
cuantificación según ecuación	-

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC

Cuadro No. 33: Valores de Rf reportados para la identificación de colorantes amarillo No.6 y rojo No. 40.

Muestra	Rf muestras	Rf estándar amarillo No.6	Rf estándar rojo No.40
A1-1	0.56		
A1-2	0.56		
A2-1	0.56		
A2-2	0.56		
A3-1	0.55		
A3-2	0.55		
B1-1	0.53		
B1-2	0.53		
B2-1	0.53		
B2-2	0.53		
B3-1	0.52		
B3-2	0.52		
C1-1	0		
C1-2	0		
C2-1	0		
C2-2	0		
C3-1	0		
C3-2	0	0.53	0.55

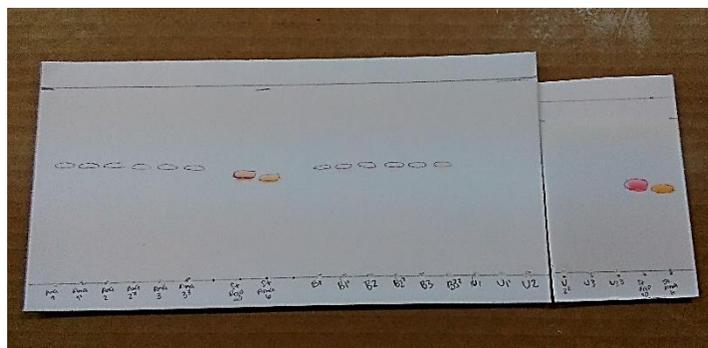
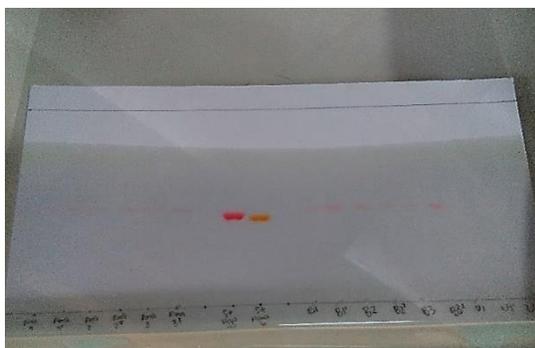
Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC

Cálculos para Rf= $\frac{\text{distancia recorrida por la mancha}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$

Ejemplo: Rf del estándar de amarillo No. 6

$$Rf = \frac{4.0\text{cm}}{7.6\text{cm}} = 0.53$$

Imagen No. 6 Cromatoplaca con estándares y muestras



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de análisis Aplicado. Edificio T-12. USAC

13.2 Proceso de validación desde limpieza de lana hasta obtención de resultados finales.

Figura No.1: Proceso de limpieza de lana.



Figura No.2: Proceso de tratamiento con NaOH 15%, alcohol y agua.



La limpieza de la lana se hizo con agua y un cepillo para quitar los restos de materia orgánica. Posteriormente se introdujo en la solución de NaOH al 15% por 1min, seguido de 30 segundos en alcohol y finalmente se lavó con agua destilada para eliminar el resto de reactivos. Se le tomó el pH para verificar que estuviera neutro.



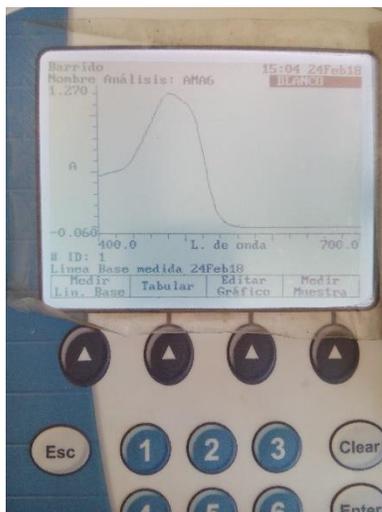
Figura No.3: Realización de las soluciones madre y curvas de calibración a partir del estándar del colorante.



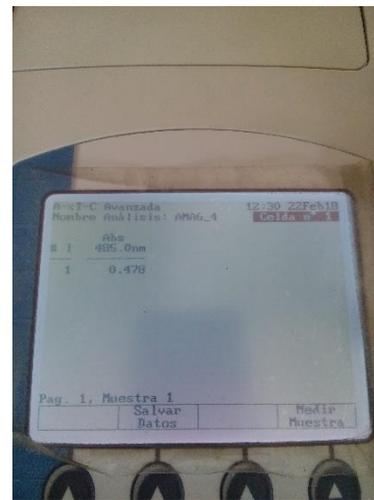
Paso 1: Pesar el estándar de cada colorante.



Paso 2: Llevar a cabo la solución madre y las curvas de calibración para cada colorante.

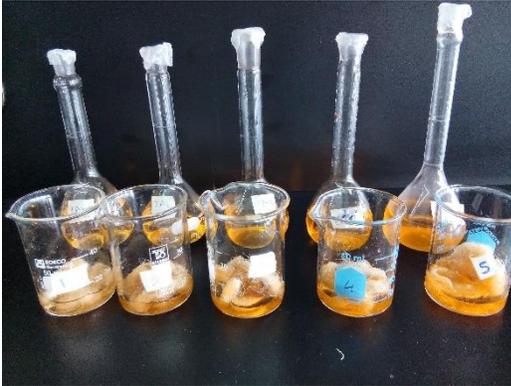


Paso 3: Determinar longitud de onda máxima para cada colorante.



Paso 4: Leer absorbancias a las diferentes longitudes de onda máxima reportadas.

Figura No.4: Verificación del porcentaje de recobro utilizando lana de oveja.



Paso 1: Agregar un trozo de lana en 10mL de solución coloreada con concentración conocida.



Paso 2: Someter a calentamiento adicionando 10 gotas de ácido acético por 20min.



Lana coloreada posterior al calentamiento.
Paso 3: Someter a calentamiento con 10mL de agua por 15min adicionando 15 gotas de Hidróxido de amonio.



Solución coloreada y lana sin color luego del segundo calentamiento.



Paso 4: Someter a centrifugación por 10min.



Paso 5: Filtrar al vacío.

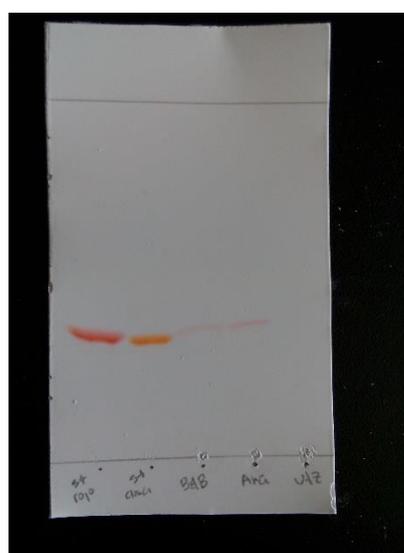


Se obtiene una solución traslúcida.



Paso 6: Lectura de la absorbancia para determinar porcentaje de recobro.

Figura No.5: Determinación de tipo de fase móvil a utilizar.



Se prepararon diferentes fases móviles con el fin de observar el comportamiento de los colorantes y muestras en cada una y determinar la mejor fase móvil.

Figura No.6: Proceso de las muestras de mermeladas para su cuantificación.



Paso 1: Identificación y pesado de la muestra.



Paso 2: Agregar 10ml de agua, reposar y agitar continuamente.



Paso 3: Trasvasar a balón de 25ml y aforar.



Paso 4: Filtrar solución coloreada obtenida.



Paso 5: Extracción del colorante a través de lana de oveja.



Paso 6: Centrifugación y filtrado.



Paso 7: Aforar en balones de 10ml y proceder a identificación y cuantificación.



Paso 8: Identificación en sílica gel.



Paso 8: Cuantificación en espectrofotómetro UV-Visible.

13.3 Certificado de Calidad del estándar del colorante Amarillo No.6 y Rojo No. 40.

FECHA ENTREGA/PRINT DATE: 20/MAY/2015

SENSIENT™

Sensient Colors - Latin America
 RODOLFO PATRON NUM. 12
 PARQUE INDUSTRIAL LERMA
 LERMA, EDO. DE MEXICO C.P. 52000
 APDO. POSTAL 17

CERTIFICADO DE ANALISIS / CERTIFICATE OF ANALYSIS
 DESCRIPCION / DESCRIPTION: AMARILLO NO. 6

NO. LOTE/LOT #: 28734
 NO. ORDEN CLIENTE/CUSTOMER ORDER#: 717/69
 REC. DEL CLIENTE/CUST RESOURCE:
 FECHA FABRICACION/MFG DATE: 01/APR/2015

RECURSO/RESOURCE: M86040020 CI:15985
 NO. ORDEN SC/ORDER #SC: 0278691
 CLIENTE/CUSTOMER: COLQUICA, S.A.
 FECHA CADUCIDAD/EXP DATE: 30/MAR/2021

PARAMETRO/PARAMETER	METODO/METHOD	ESPECIFICACION/SPECIFICATION		RESULT
		MIN	MAX	
CONCENTRACIÓN DE COLOR(PUREZA)	MPMCC0480	85.00	100.00	85.09
CUENTA BACTERIANA TOTAL(UFC/g)	MPMCC136	.00	500.00	10.00
HONGOS Y LEVADURAS (UFC/g)	MPMCC137	.00	100.00	.00
COLIFORMES TOTALES (UFC/g)	MPMCC141	.00	10.00	.00
SUMA DE HUMEDAD CLORUROS Y SUL	MPMCC0421	.00	15.00	10.46
MATERIAL INSOLUBLE EN AGUA	MPMCC0460	.000	.200	.017
EXTRACTOS ETÉREOS	MPMCC0470	.000	.200	.040
INTERMEDIARIOS	MPMCC0200	.00	.50	.10
PLOMO COMO Pb (ppm)	MPMCC1650	.00	2.00	.07
COLORES SUBSIDIARIOS	MPMCC0201	.00	5.00	3.43
ARSÉNICO COMO As (ppm)	MPMCC165A	.00	1.00	.06
AMINAS AROMÁTICAS PRIMARIAS NO	MPMCC160	.00	.01	.00
METALES PESADOS (ppm)	MPMCC1200	.000	20.000	5.000
CADMIO (ppm)	MPMCC165C	.00	1.00	.00
MERCURIO (ppm)	MPMCC165H	.00	1.00	.02

Gloria Merchant
 Gerente de Control De Calidad

PAGE 1 OF 1

SENSIENT Sensient Certificate of Analysis

SENSIENT COLORS, S.A. DE C.V.
(722) 265 11 00

Date: 20-Jul-2016
Time: 15:53:43

Page 1 of 1

Name: COLQUICA S A
Address: GUATEMALA CIUDAD
GUATEMALA CIUDAD

Customer PO#: GT
Customer Order: 939/10
Item: 104863 ROJO NO. 40
M77070020

Customer Item: 30710
Lot/SN: 08-Apr-2016
Manufacture Date: 07-Apr-2022
Lot Expiration Date:

DESCRIPCION / DESCRIPTION:

Test Identification	Description	Min Value	Max Value	Test Value	Status	Date
MPMCC0270	% INTERMEDIARIOS (ROJO 40)	0	1.50	.07		11-Apr-2016
MPMCC0271	% SUBSIDIARIOS (ROJO 40)	0	3.00	.32		11-Apr-2016
MPMCC0421	% SUMA H2O NACL NA2SO4	0	15.00	12.15		11-Apr-2016
MPMCC0460	% MATERIAL INSOLUBLE EN H2O	0	.200	.012		11-Apr-2016
MPMCC0470	% EXTRACTOS ETEREOS	0	.200	.040		11-Apr-2016
MPMCC0480	% CONCENTRACION DE COLOR	85.00	100.00	88.44		11-Apr-2016
MPMCC1200	METALES PESADOS (ppm)	0	20.000	5.000		11-Apr-2016
MPMCC136	CUENTA BACTERIANA TOTAL(UFC/g)	0	500.00	0		11-Apr-2016
MPMCC137	HONGOS Y LEVADURAS (UFC/g)	0	100.00	0		11-Apr-2016
MPMCC141	COLIFORMES (UFC/g)	0	10.00	0		11-Apr-2016
MPMCC152	DETERMINACION DE AMINAS AROMAT	0	.010	.001		11-Apr-2016
MPMCC1650	PLOMO COMO Pb (ppm)	0	2.000	.080		11-Apr-2016
MPMCC165AS	ARSENICO COMO As (ppm)	0	1.000	.050		11-Apr-2016
MPMCC165CD	CADMIO (ppm)	0	1.00	.68		11-Apr-2016
MPMCC165HG	MERCURIO (ppm)	0	1.00	0		11-Apr-2016


Gloria Merchant, Gte Aseguramiento y Control de Calidad



Br. Sindy Alejandra Palacios Castillo

Autora



Licda. Julia Amparo García Bolaños

Asesora



Licda. Aylín Santizo Juárez

Revisora



M.A. Hada Marieta Alvarado Beteta

Directora de Escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano