



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MODALIDAD: INVESTIGACIÓN



TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS
GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS
DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO PARA
OPTAR AL GRADO DE QUÍMICO Y FARMACÉUTICO**

AUTOR:

JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NÚÑEZ

TUTOR:

CARLOS VALDIVIEZO ROGEL MSc.

COTUTORA:

TATIANA ZAMORA ZAMORA Ph. D.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2018



**FACULTAD: CIENCIAS QUIMICAS
CARRERA: QUIMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN**



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



SENESCYT
Secretaría Nacional de Educación Superior,
Ciencia, Tecnología e Innovación

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN		
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	" Evaluación de la concentración de tartrazina en bebidas gaseosas mediante la aplicación de técnicas analíticas desarrolladas con detección ultravioleta-visible "	
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Macías Núñez Joshia Alexander	
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Q.F. Valdiviezo Rogel Carlos; Zamora Zamora Tatiana	
INSTITUCIÓN:	Universidad de Guayaquil	
UNIDAD/FACULTAD:	Facultad de Ciencias Químicas	
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	Química y Farmacia	
GRADO OBTENIDO:	Tercer Nivel – Química Farmacéutica	
FECHA DE PUBLICACIÓN:	2018	No. DE PÁGINAS: 86
ÁREAS TEMÁTICAS:	Investigación	
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Tartrazina, Bebidas Gaseosas, Espectrofotometría, Cromatografía, Validación de método	
RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras):	<p>La tartrazina es un aditivo alimentario, perteneciente al grupo de los colorantes alimentarios. Las bebidas gaseosas, objeto de estudio, es uno de los productos alimenticios procesados en el cual con mayor frecuencia incluye el uso de este aditivo, además de ser preferidos por los consumidores. La tartrazina se la relaciona con reacciones alérgicas, sensibilidad e hiperactividad en los niños; debido a estos problemas y sus efectos adversos sobre la salud humana se considera un aditivo alimentario nocivo, que requiere de dosis admisibles reguladas. Los productos que contienen tartrazina deben estar etiquetados según la ley; sin embargo, esta etiqueta no especifica la concentración real que contiene el producto, aunque está dispuesta una concentración de ingesta diaria de acuerdo con la legislación local. La determinación de tartrazina es posible mediante la aplicación de espectrofotometría con detección UV-VIS y por cromatografía de líquidos con detección UV. En el presente trabajo se optimizaron las condiciones analíticas previo a la validación de ambos métodos con resultados satisfactorios en muestras ensayadas de bebidas gaseosas, y se realizó la comparación de los mismos en base a parámetros estadísticos. Se demostró un comportamiento similar de los resultados a niveles de concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pero a concentraciones más bajas se evidencian diferencias significativas.</p>	
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0979366552	E-mail: joshia.maciasn@ug.edu.ec
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: CIENCIAS QUÍMICAS	
	Teléfono: 04-229-3680	
	E-mail: fcquimic@ug.edu.ec	

**Dr. CARLOS SILVA HUILCAPI
DIRECTOR DE LA CARRERA
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**

Guayaquil-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de:
"EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE" por el estudiante **JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NÚÑEZ C.I. 0930890181**, indicando que han cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- Las estudiantes demuestran conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que el estudiante está apto para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,



M.Sc. CARLOS J. VALDIVIEZO ROGEL.
C.I.: 0704785971

*Recibido
21/8/18*



**FACULTAD: CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA: QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN**



Guayaquil, Agosto 31 del 2018

Sr. Dr.
CARLOS SILVA HUILCAPI
DIRECTOR DE LA CARRERA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación **"EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE"** del estudiante JOSHIA ALEXANDER MACIAS NUÑEZ. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 20 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo 10 años.
- La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que el estudiante JOSHIA ALEXANDER MACIAS NUÑEZ está apto para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

DRA. ZORAIDA BURBANO GOMEZ M.Sc

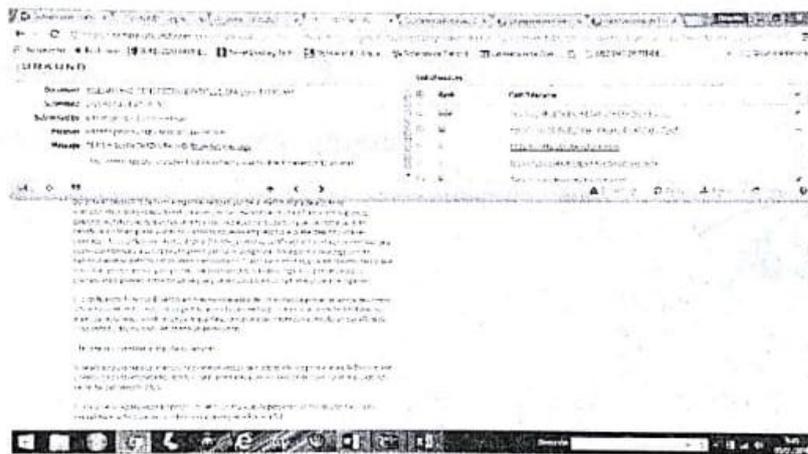
DOCENTE TUTOR REVISOR

C.I. 0909393274

CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado **CARLOS VALDIVIEZO ROGEL Msc.**, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por **JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NÚÑEZ** con cedula de ciudadanía **#0930890181** con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **QUÍMICO Y FARMACÉUTICO**.

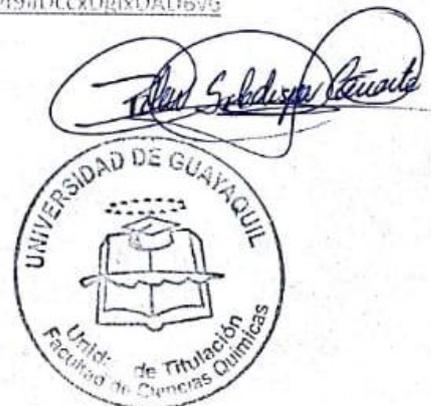
Se informa que el trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE"**, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio (indicar el nombre del programa antiplagio empleado) quedando el _____% de coincidencia.



<https://securi.orkund.com/view/16964445-251036-988649#DccxDgIxDAD5v6>

M.Sc. CARLOS J. VALDIVIEZO ROGEL

C.I.: 0704785971



URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: TARTRAZINA URKUND 1.docx (D40857805)
Submitted: 8/17/2018 5:08:00 PM
Submitted By: carlos.valdiviezor@ug.edu.ec
Significance: 2 %

Sources included in the report:

http://www.elpoderdelconsumidor.org/wp-content/uploads/1107_Colorantes_en_productos_escuelas.pdf
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1651>
http://www.repositorio.usac.edu.gt/2072/1/06_3668.pdf
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000600002>
<https://rua.ua.es/dspace/handle/10045/3840>
http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/juia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf

Instances where selected sources appear:





FACULTAD: CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA: QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN



**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA
EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO
ACADÉMICOS**

Yo, **JOSHIA ALEXANDER MACIAS NUÑEZ** con C.I. N° 0930890181 certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es **“EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE”** es de mi absoluta propiedad y responsabilidad y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NUÑEZ

C.I. 0930890181

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.



FACULTAD: CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA: QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN



APROBACIÓN DEL TUTOR

Guayaquil, 24 de Agosto del 2018.

En calidad de tutor del trabajo de titulación, Certifico: que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es **"EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE"**, presentado por el Sr. **JOSHIA ALEXANDER MACIAS NUÑEZ**, con cédula de ciudadanía N° **0930890181**, previo a la obtención del título de Químico y Farmacéutico.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Antiplagio del programa URKUND. Lo certifico.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carlos Valdiviezo Rogel". The signature is written over a horizontal line.

Q.F. CARLOS VALDIVIEZO ROGEL, MSc.



Universidad de Guayaquil

**FACULTAD: CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA: QUÍMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÓN**



Guayaquil, Agosto 31 del 2018

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrado **DRA. ZORAIDA BURBANO GÓMEZ TUTOR REVISOR**, del trabajo de titulación **"EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TECNICAS ANALITICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE"**, certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **JOSHIA ALEXANDER MACIAS NUÑEZ**, con C.I. No. 0930890181, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **QUIMICO Y FARMACEUTICO**, en la Facultad de Ciencias Químicas, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

DRA. ZORAIDA BURBANO GOMEZ M.Sc

DOCENTE TUTOR REVISOR

C.I. 0909393274

El Tribunal de Sustentación del Trabajo de Titulación del Sr. JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NÚÑEZ, después de ser examinado en su presentación, memoria científica y defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación.



Q.F. ZORAIDA BURBANO GÓMEZ MSc.
PRESIDENTE-MIEMBRO 1 DEL TRIBUNAL



Q.F. MICHAEL RENDÓN MORAN MSc.
DOCENTE-MIEMBRO 2 DEL TRIBUNAL



Q.F. MARÍA JIMÉNEZ HEINERT MSc.
DOCENTE-MIEMBRO 3 DEL TRIBUNAL



Ab. FRANCISCO PALOMEQUE ROMERO Mgs.
SECRETARIO GENERAL

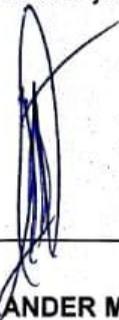
CARTA DE AUTORÍA DEL TRABAJO:

“EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE”

Guayaquil, 20 de Agosto de 2018

Yo, **JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NÚÑEZ**, autor de este trabajo declaro ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este **TRABAJO DE TITULACIÓN** me corresponde a mí exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaro también es de mi autoría, que todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además, ratifico que este trabajo no ha sido parcial ni totalmente presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad nacional, ni una extranjera.



JOSHIA ALEXANDER MACÍAS NÚÑEZ

C.I.: 0930890181

DEDICATORIA

Dedico todo mi esfuerzo y dedicación plasmados en este texto científico a mi querida familia; mama, papa, hermanos y mascotas, ustedes son la base de mi felicidad.

AGRADECIMIENTO

A mis estimados docentes tutores, Carlos Valdiviezo Rogel Msc. y Tatiana Zamora Zamora Ph.D. quienes me brindaron su confianza y apoyaron con su gran experticia e inteligencia, además de hacer posible la realización de mi tesis.

A Neidys Sánchez Hernández Msc. que me brindo su conocimiento y consejos en la parte experimental de la tesis, así mismo me dio paso al mundo laboral.

A Caleb Brett Ecuador S.A. empresa donde realice mis análisis de tesis y forje mi carácter profesional.

A todos mis familiares que me apoyaron económicamente en los momentos más duros.

A todos quienes me brindaron su apoyo de forma directa o no de forma incondicional.

A todos gracias infinitas.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA	3
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. ADITIVOS ALIMENTARIOS	4
1.1.1. Justificación del uso de los aditivos	4
1.2. COLORANTES	4
1.1.2. Tipos de colorantes	5
1.1.3. Colorantes Naturales	5
1.1.4. Colorantes Sintéticos	6
1.1.5. Ventajas y desventajas de colorantes naturales y artificiales	7
1.3. TARTRAZINA	8
1.4. LEGISLACIÓN PARA LA TARTRAZINA	9
1.5. TARTRAZINA EN LA SALUD	9
1.1.6. Metabolismo de la tartrazina y metabolitos	10
1.6. BEBIDAS GASEOSAS.	11
1.7. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	12
1.8. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)	14
1.9. HPLC FRENTE A ESPECTROFOTOMETRÍA	16
1.10 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO	17
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO	22
2.1. METODOLOGÍA	22
2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIO	23
2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
2.3.1. Recolección de muestras	23
2.3.2. Equipos y reactivos	24
2.3.3. Validación de un método analítico por espectrofotometría con detección UV-VIS.	25
2.3.4. Preparación y lecturas de la muestra espectrofotometría:	29
2.3.5. Validación de un método analítico por cromatografía con detección UV.	30
2.3.6. Preparación y lectura de la muestra por HPLC	33

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
3.1. RESULTADOS ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	34
3.1.1. Selectividad	34
3.1.2. Linealidad	35
3.1.3. Efecto Matriz	39
3.1.4. Sensibilidad del calibrado.....	42
3.1.5. Límite de detección y cuantificación	42
3.1.6. Exactitud:.....	43
3.1.7. Precisión	43
3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES EN BEBIDAS GASEOSAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	45
3.3. RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA	48
3.3.1. Selectividad	49
3.3.2. Linealidad	49
3.3.3. Sensibilidad del calibrado.....	51
3.3.4. Límite de detección y cuantificación	51
3.3.5. Exactitud:.....	52
3.3.6. Precisión	54
3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES EN BEBIDAS GASEOSAS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN UV	57
3.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.	58
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Ventajas y desventajas de colorantes naturales y artificiales</i>	7
<i>Tabla 2 Parámetros de Validación aplicados a diferentes métodos</i>	18
<i>Tabla 3 Metodología de investigación</i>	22
<i>Tabla 4 Linealidad del sistema de la tartrazina</i>	37
<i>Tabla 5 Prueba T-student linealidad</i>	38
<i>Tabla 6 Linealidad de la tartrazina en matriz contaminada</i>	40
<i>Tabla 7 Prueba T-student linealidad</i>	41
<i>Tabla 8 Datos de la señal blanco</i>	42
<i>Tabla 9 Porcentaje de recuperación obtenido</i>	43
<i>Tabla 10 Lecturas a 3 niveles de concentración evaluando repetibilidad</i>	44
<i>Tabla 11 Lecturas en 1 nivel de concentración, diferentes días evaluando reproducibilidad</i>	44
<i>Tabla 12 Lecturas pre y post- filtrado Muestra "C"</i>	45
<i>Tabla 13 Lecturas pre y post- filtrado Muestra "H"</i>	46
<i>Tabla 14 Lecturas pre y post- filtrado Muestra "A"</i>	46
<i>Tabla 15 Concentración de tartrazina en muestras reales por espectrofotometría</i>	47
<i>Tabla 16 Selectividad del método cromatográfico</i>	49
<i>Tabla 17 Datos de la regresión lineal de la tartrazina en cromatografía</i>	49
<i>Tabla 18 Estadísticas de la regresión cromatografía</i>	50
<i>Tabla 19 Análisis de Varianza linealidad cromatografía</i>	51
<i>Tabla 20 Datos de la curva recuperación 1</i>	53
<i>Tabla 21 Porcentaje de recuperación</i>	53
<i>Tabla 22 Datos de la curva recuperación 2</i>	54
<i>Tabla 23 Porcentaje de recuperación 2</i>	54
<i>Tabla 24 Repetibilidad</i>	55
<i>Tabla 25 Reproducibilidad</i>	55
<i>Tabla 26 Concentración de tartrazina en muestras reales</i>	57
<i>Tabla 27 T-student análisis de muestras</i>	58
<i>Tabla 28 Muestras finales cromatografía y espectrofotometría</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS:

<i>Figura 1</i>	<i>Formula molecular de la tartrazina.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2</i>	<i>Configuración más usada en la composición de un espectrofotómetro.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3</i>	<i>Espectro de absorción.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4</i>	<i>Separación de una muestra A y B por cromatografía de elución en columna.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5</i>	<i>Barrido espectral obtenido mediante espectrofotómetro en el rango de 200 – 600 nm (equipo Melter Toledo Genesys 10s Uv-Vis).....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 6</i>	<i>Barrido espectral obtenido mediante espectrofotómetro en el rango de 200 – 500 nm Thermo Hexios B Uv- Vis</i>	<i>35</i>
<i>Figura 7</i>	<i>Curva de calibración 1 linealidad.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 8</i>	<i>Curva de calibración 2 linealidad.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 9</i>	<i>Curva de calibración 3 linealidad.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 10</i>	<i>Curva de calibrado a 5 diferentes concentraciones de la tartrazina.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 11</i>	<i>Curva de calibración 1 "Fortificada".....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 12</i>	<i>Curva de calibración 2 "Fortificada".....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13</i>	<i>Curva de calibración 3 "Fortificada".....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 14</i>	<i>Linealidad global de la tartrazina en matriz Fortificada.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 15</i>	<i>Linealidad global tartrazina en cromatografía</i>	<i>50</i>
<i>Figura 16</i>	<i>Curva porcentaje de recuperación 1.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 17</i>	<i>Curva porcentaje de recuperación 2.....</i>	<i>53</i>

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Certificado uso de laboratorio privado.....	67
Anexo 2 Recuperación en función a la concentración del analito.....	68
Anexo 3 Tabla de Distribución t.student.....	68
Anexo 4 Datos linealidad Tartrazina.....	69
Anexo 5 Linealidad Efecto Matriz.....	70
Anexo 6 Cromatograma con las condiciones obtenidas bibliográficamente por (Alves et al., 2008).....	71
Anexo 7 Cromatograma Fase móvil metanol Agua Buffer a.a., 20:35:45.....	71
Anexo 8 Cromatograma metanol Acetonitrilo Buffer a.a., 25:25:50.....	72
Anexo 9 Cromatograma Acn Agua Buffer a.a., 50:15:35.....	72
Anexo 10 Cromatograma Metanol Agua Buffer a.a., 20:25:55.....	73
Anexo 11 Evaluación de la selectividad (tiempos de retención).....	73
Anexo 12 Cromatogramas de blancos de matriz.....	75
Anexo 13 Linealidad de la tartrazina.....	76
Anexo 14 Análisis de muestras reales (Extracto).....	83

“EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TARTRAZINA EN BEBIDAS GASEOSAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE”

Autor: Joshia Macías Núñez

RESUMEN

La tartrazina es un aditivo alimentario, perteneciente al grupo de los colorantes alimentarios. Las bebidas gaseosas, objeto de estudio, es uno de los productos alimenticios procesados en el cual con mayor frecuencia incluye el uso de este aditivo, además de ser preferidos por los consumidores. La tartrazina se la relaciona con reacciones alérgicas, sensibilidad e hiperactividad en los niños; debido a estos problemas y sus efectos adversos sobre la salud humana se considera un aditivo alimentario nocivo, que requiere de dosis admisibles reguladas. Los productos que contienen tartrazina deben estar etiquetados según la ley; sin embargo, esta etiqueta no especifica la concentración real que contiene el producto, aunque está dispuesta una concentración de ingesta diaria de acuerdo con la legislación local. La determinación de tartrazina es posible mediante la aplicación de espectrofotometría con detección UV-VIS y por cromatografía de líquidos con detección UV. En el presente trabajo se optimizaron las condiciones analíticas previo a la validación de ambos métodos con resultados satisfactorios en muestras ensayadas de bebidas gaseosas, y se realizó la comparación de los mismos en base a parámetros estadísticos. Se demostró un comportamiento similar de los resultados a niveles de concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pero a concentraciones más bajas se evidencian diferencias significativas.

Palabras Clave: Tartrazina, Bebidas Gaseosas, Espectrofotometría, Cromatografía, Validación de método

ABSTRACT

Tartrazine is a food additive, it belongs to the group of food dyes. Soft drinks object of study is one of the processed food products that most frequently maintains the use of the additive are one of the most preferred products by customers, which is the sample of interest of the current research. Tartrazine it's related with allergic reactions, sensitiveness and hyperactivity on children, it is considered a harmful food additive. Products containing tartrazine must be law labeled if they are consumables, but this label doesn't specify the real concentration that the product contains. Although there is a specific daily intake according to the local legislation. The methods used were, spectrophotometry UV-VIS and high performance liquid chromatography UV. Both methods were correctly validated. A comparison between the methods used in the determination of tartrazine in carbonated drinks was made with statistical parameters. It was shown that the two methods from 10 mg L⁻¹ similar results are obtained, but at lower concentrations there are significant differences.

Keywords: Tartrazine, Soft Drinks, Spectrophotometry, Chromatography, Method Validation

INTRODUCCIÓN

Con el beneficio del avance de la industria química, la Industria alimentaria comenzó a utilizar un gran número de aditivos en los alimentos, para mejorar el tiempo de vida útil, ofrecer alimentos más seguros y así satisfacer las expectativas del mercado consumidor. Los aditivos alimentarios son sustancias químicas naturales o sintéticas que se añaden a los alimentos para mejorar características organolépticas como el sabor, textura, apariencia o para favorecer el desarrollo tecnológico en la elaboración de productos alimenticios (Ibañez, Torre, y Irigoyen, 1963).

Precisamente, desde un punto de vista tecnológico Campos y colaboradores (2013) mencionan que los aditivos alimentarios desempeñan un papel importante en el desarrollo de alimentos. Sin embargo, en los últimos años, la población se ha vuelto cada vez más cautelosa sobre la seguridad de los diversos elementos relacionados con la seguridad alimentaria; en ese sentido, los aditivos alimentarios se encuentran entre los compuestos más controvertidos

Dentro de los aditivos alimentarios, los colorantes tienen la función de dar una gama amplia de color de acuerdo al producto en el cual se vaya a emplear. Entre la gran variedad de colorantes, los de tipo sintético son derivados de reacciones químicas, mientras que los naturales se encuentran en la naturaleza; tratándose de compuestos orgánicos que al aplicarse a un sustrato (como papel, plástico o alimento, entre otros) le confiere un color más o menos permanente. Un colorante se aplica en disolución o emulsión, y el sustrato debe tener cierta afinidad para absorberlo (Alayo y Montoya, 2013).

El amarillo No.5, denominado como tartrazina, que de acuerdo con la norma de la Unión Europea obedece al código E-102. Se trata de un colorante artificial tipo "azo" constituido por la sal trisódica de ácido 5-oxo-1-(p-sulfonil)-4-[(o-sulfonil) azo] -2- pirazolina -3- carboxilo. Este compuesto se presenta en forma de polvo de color amarillo, es soluble en agua e incompatible con la lactosa y el ácido ascórbico; con metabolización a nivel el hígado luego de su absorción (Alayo y Montoya, 2013).

Varios estudios que se han realizado en los últimos 30 años según Campos Honorato y colaboradores (2013), han llegado a evidenciar que consumir colorantes sintéticos en productos alimenticios en concentraciones moderadas

puede provocar efectos adversos tales como hiperactividad entre otros cambios de la conducta en infantes. Al respecto, McCann y colaboradores (2007) indica que la tartrazina a una concentración de 7,5 mg/Kg en bebidas artificiales produce hiperactividad en niños. Por su parte, el reglamento (CE) No 1333/2008 sobre aditivos alimentarios explicado en el Diario Oficial De La Unión Europea (2008) menciona explícitamente que: “la tartrazina puede tener efectos negativos sobre la actividad y la atención de los niños en el desarrollo de sus actividades”.

De acuerdo con las características químicas de la tartrazina, en base a la estructura de la molécula, resulta propio su análisis mediante la detección ultravioleta-visible; por lo cual la aplicación de técnicas netamente espectrofotométricas o más aún las técnicas de cromatografía facilitan su cuantificación de manera precisa. Cabe mencionar que, los estudios sobre aditivos alimenticios, contaminantes o adulterantes, merecen la dedicación de los esfuerzos de los investigadores para el desarrollo de métodos analíticos cada vez más robustos, sensibles, selectivos, y factibles económicamente; destacándose en ese contexto las técnicas instrumentales antes mencionadas.

Teniendo en cuenta, además, la necesidad de promover información técnica sobre los niveles de concentración de este tipo de aditivos en la consecución del análisis y fortalecimiento de límites permisibles a nivel nacional en productos alimenticios elaborados; el presente proyecto propone la evaluación de la tartrazina como un aditivo utilizado en bebidas gaseosas de alto consumo. Para lo cual, se contempla el desarrollo y validación de dos métodos analíticos, por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS), y por cromatografía de líquidos con detección UV-VIS respectivamente. Ello, permitirá establecer el estudio comparativo de los niveles de concentración del compuesto y la necesidad de declaración del contenido del aditivo en las etiquetas de los productos, y en cumplimiento con los límites permisibles de la legislación nacional e internacional. De esta manera, se obtendrá información relevante para su análisis dentro de las políticas de control de la calidad de alimentos masivos en el marco de la seguridad alimentaria que promueve el estado ecuatoriano a través de las agencias de regulación pertinentes.

PROBLEMA

¿Presentarán diferencias significativas las determinaciones de tartrazina en bebidas gaseosas, obtenidos a partir de la validación de distintas técnicas analíticas con detección ultravioleta?

HIPÓTESIS

Las determinaciones de tartrazina en bebidas gaseosas obtenidas a partir de distintas técnicas analíticas validadas con detección ultravioleta presentaran diferencias significativas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el nivel de concentración de tartrazina en bebidas gaseosas mediante la aplicación de técnicas analíticas por espectrofotometría y cromatografía de líquidos con detección ultravioleta

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar un método analítico para la determinación de tartrazina bebidas gaseosas mediante espectrofotometría con detección ultravioleta.
2. Validar un método analítico para la determinación de tartrazina en bebidas gaseosas mediante cromatografía de líquidos con detección ultravioleta.
3. Establecer el estudio comparativo de la determinación de tartrazina en bebidas gaseosas mediante espectrofotometría y cromatografía de líquidos.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. ADITIVOS ALIMENTARIOS

Con la importancia que los aditivos alimentarios van adquiriendo día a día es necesario saber el concepto de estos, según Argueta (2014) son sustancias químicas que no tienen un valor nutritivo, ni se usa como un ingrediente clave del alimento. La adición de estos aditivos a los alimentos tiene como intención cambiar aspectos organolépticos, preservación y preparación de los alimentos. Esta adición se puede dar en cualquiera de las etapas de la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetamiento, transporte o conservación del alimento. El uso de los aditivos alimentarios será justificado siempre y cuando este ofrezca un beneficio y no presente peligro alguno para la salud de quienes lo consumen.

1.1.1. Justificación del uso de los aditivos

La norma del Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) en referencia al Codex Alimentarium INEN-CODEX 192 (2016) especifica que el uso de estos estará justificado siempre y cuando no presenten riesgos para el consumidor, no induzcan a errores en los procesos de fabricación del producto y que cumpla con una o más de las funciones tecnológicas que Codex propone, tales como:

1. Conservar la calidad nutricional del alimento
2. Proporcionar ingredientes o constituyentes necesarios para grupos de consumidores con necesidades específicas
3. Ayudar en las diferentes etapas de la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, conservación del alimento.

1.2. COLORANTES

Los colorantes conforman uno de los grupos de aditivos alimentarios, estos les dan el color deseado a cada alimento elaborado, lo cual mejora su atractivo. La mayoría de los colorantes sintéticos son de carácter orgánico, y probablemente los consumidores tienden a creer que son inofensivos por falta de información,

pero actualmente las dudas acerca de sus riesgos van en incremento. Todos los colorantes agregados a alimentos deben ser regulados por normas nacionales e internacionales y tener un límite máximo permisible (LMP) sobre la base de datos de ingesta diaria, sin embargo, no todas las normas sobre seguridad alimentaria contienen o decretan sobre el control de este tipo de compuestos colorantes (Rodríguez, Schenone, Sobrero y Marsili, 2014).

El primer impacto que el consumidor tiene sobre un alimento es su color, como menciona Sánchez (2013) “los colorantes tienden a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor, y puede llegar a definir el éxito o fracaso de un producto”, esto debido a que el consumidor relaciona el color correspondiente con el sabor y olor esperado por el mismo.

1.1.2. Tipos de colorantes

En la actualidad existe una diversidad de colorantes en el mercado que están a disposición de la industria de alimentos. Se sabe que los colorantes pueden ser naturales o sintéticos; dependiendo si se los obtiene a partir de una extracción del vegetal, animal o mineral, en el primer caso; o por el contrario los también llamados colorantes artificiales, que se obtienen como producto de un proceso químico o físico. Entre la clasificación de los colorantes tanto naturales como artificiales o sintéticos podemos mencionar que en el grupo de los de tipo natural se presenta una sub-clasificación de acuerdo a su solubilidad, siendo hidrosolubles, o liposolubles. En el caso de los colorantes artificiales se puede presentar la sub-clasificación como grupos azoicos y compuestos no azoicos (Sánchez, 2013).

1.1.3. Colorantes Naturales

Los colorantes naturales son el color propio de un producto o un alimento, sin necesidad de adicionar un colorante artificial para mantenerlo. Los colorantes naturales se declaran en la gran mayoría como inofensivos por lo cual presentan menos limitaciones para su utilización que los colorantes sintéticos. Tradicionalmente, los colorantes naturales se han empleado durante mucho tiempo para dar color a los productos alimenticios. Algunos de los más comunes

son: los carotenoides, la clorofila, la antocianina y la cúrcuma (Ensuncho, López, & Robles, 2012).

1.1.4. Colorantes Sintéticos

Los colorantes artificiales o sintéticos son solubles en agua, gracias a la presencia de grupos de ácido sulfónico, provocando la facilidad de su utilización, estos forman diferentes sales sódicas en líquidos y materiales muy viscosos (Ensuncho y colaboradores, 2012).

Los colorantes azoicos de origen sintético son frecuentemente usados en la industria de alimentos y se pueden encontrar presentes en gelatinas, jugos de frutas comerciales, aperitivos, postres, entre otros dando como resultados una buena apariencia del producto (Ensuncho y colaboradores, 2012).

Entre los colorantes sintéticos existen muchos que no son aptos para el consumo humano. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria priorizó la evaluación de los colorantes azoicos a partir de ciertos datos en el Reino Unido que sugiere que algunos colorantes artificiales podrían ser capaces de inducir hiperactividad y falta de concentración en niños, cuando se consumen en conjunto algunos productos que contienen ácido benzoico. Estos compuestos se diferencian porque son poco polares, atraviesan las membranas intestinales y se pueden solubilizar en grasas y/o lípidos, incorporándose al organismo; mientras que los colorantes autorizados son muy polares y solubles en agua por lo tanto son excretados y no tienden a absorberse y metabolizarse (Bejarano y Suárez, 2015).

1.1.5. Ventajas y desventajas de colorantes naturales y artificiales

Tabla 1: Ventajas y desventajas de colorantes naturales y artificiales

Colorantes	Ventajas	Desventajas
Naturales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta aceptación por su origen natural. ▪ Amigable con el medio ambiente. ▪ Empleados en la elaboración o producción de alimentos, textiles y objetos de arte. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Menor intensidad de color en productos por lo que se requeriría mayor cantidad de este. ▪ Menor uso industrial. ▪ Complejo proceso de extracción. ▪ Algunos de ellos son tóxicos para la salud. ▪ Los alimentos elaborados pueden producir sabores indeseados.
Sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son más estables y tienen mejor uniformidad. ▪ Generalmente no producen sabores extraños. ▪ Mayor uso industrial. ▪ Mayor intensidad de color en productos procesados. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Restricción de colorantes en ciertos países. ▪ Posible causante de alteraciones en la salud. ▪ Mayor control, y exigencias en el uso de alimentos

1.3. TARTRAZINA

Los colorantes para poder ser utilizados en la industria de alimentos, reciben un nombre o código de acuerdo a la clasificación y origen del compuesto. La tartrazina, es conocida como E-102 según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2009) o FD& C Amarillo #5 según la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, 2015) o C.I. 19140 para referencia en el Índice Internacional de Color.

Es un colorante artificial amarillo, cuya forma molecular es $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ y tiene una masa molecular equivalente a 534,4 unidades de masa. Según su nomenclatura IUPAC se trata del compuesto 4,5- dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-4-[(4-sulfofenil)azol]-1-H-pirazol-3-carboxílico, sal trisódica. Este colorante es característico por tener un grupo azo (-N=N-). Está presente en forma de polvo brillante, de color amarillo – naranja, no tiene olor característico, es higroscópico (absorbe agua), estable en ácidos, soluble en agua y se solubiliza poco en etanol.

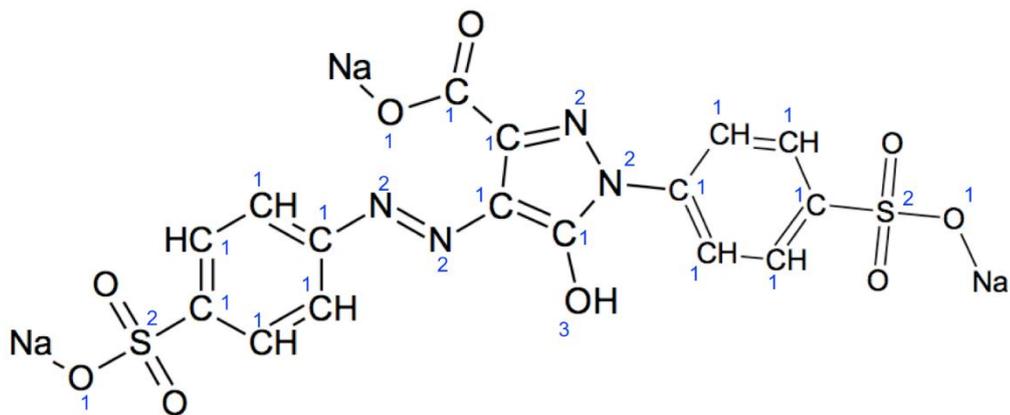


Figura 1 Formula molecular de la tartrazina

Fuente: (EFSA, 2009)

Este aditivo se absorbe casi en su totalidad cuando es ingerido como parte del alimento procesado, y su metabolismo se realiza a nivel hepático. Es ampliamente utilizado en bebidas, snacks, repostería, variedad de tipos de dulces, productos lácteos como yogurt, salsas y muchos otros productos de consumo masivo (Argueta, 2014).

1.4. LEGISLACIÓN PARA LA TARTRAZINA

El contenido de tartrazina en bebidas gaseosas, según la NTE INEN 1101 (2016) tercera revisión, exclusiva para este tipo de productos, indica que debe tener una concentración específica de 200 mg/Kg en base a una IDA de 7 mg/Kg, aunque en la NTE INEN 1101 (2017) cuarta revisión no se menciona ningún dato al respecto. Otras varias normativas mencionan el mismo valor de límite tolerable, pero considera diferentes valores de ingesta diaria admisible. Según la FDA, el IDA es de 5 mg/Kg, mientras que la FAO/OMS referencia un valor de 7,5 mg/Kg, y otros autores como Rodríguez y colaboradores (2014) por medio del Código Alimentario Argentino menciona un valor de 2,5 mg/Kg para la ingesta diaria máxima recomendada de tartrazina.

Esto implicaría que la norma ecuatoriana es menos estricta indicando un valor inferior de concentración máxima e IDA, con respecto a otras normas internacionales, por lo cual podría tener consecuencias si no se establece los estudios pertinentes y el uso o desarrollo de métodos precisos para cuantificar los niveles de tartrazina, incluso para el consecuente establecimiento de límites máximos permisibles (LMP) que aseguren una ingesta segura.

Cabe destacar que el reglamento 1333/2008 del Diario Oficial De La Unión Europea, (2008) obliga a que los alimentos que contengan E-102, tartrazina, deberán mencionar en sus etiquetas lo siguiente: "Puede tener efectos negativos sobre la actividad y la atención de los niños" y se ha relacionado con la hiperactividad en los niños (Prado, Hernández, Moreno, y Preciado, 2012). Mientras que la NTE INEN 2739-1 (2014) establece que se debe mencionar de manera obligatoria si lleva este aditivo pero no los efectos adversos que podría causar.

1.5. TARTRAZINA EN LA SALUD

Desde décadas atrás se ha venido estudiando los efectos adversos que puede provocar este aditivo; Schauss (1984) relacionó la hiperactividad frente al consumo de alimentos que contienen colorantes artificiales. Bateman y colaboradores (2004) concluyó que existiría un cambio de conducta en niños de 3 años, así como menciona posibles reacciones alérgicas observadas en la

población estudiada. Investigaciones realizadas en la Universidad de Southampton, reportan afectaciones leves y moderadas en relación a problemas de hiperactividad o alteración de la atención en niños en cuya dieta diaria durante un tiempo prolongado se incluyó el consumo de productos con ciertos niveles de tartrazina (McCann y colaboradores; Nettis, Colanardi, Ferrannini, y Tursi, 2003).

Doguc, Ceyhan, Ozturk, y Gultekin (2013) realizaron ensayos con animales de experimentación en el cual administraron dosis moderadas de tartrazina, se demostró que la actividad motora en ratas hembras durante su gestación se vio aumentada, comenzando a explorar más de lo normal con signos de ansiedad; así mismo en un estudio similar se observó cambios en el comportamiento de ratones (Tanaka, 2006).

También se ha demostrado el efecto de la tartrazina sobre los marcadores bioquímicos como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y la catalasa presente en órganos importantes en ratas machos albinos jóvenes (Amin, Abdel, y Abd E, 2010). La tartrazina puede causar efectos adversos tanto en los marcadores bioquímicos en el cerebro prescribiendo los niveles de IDA en ratas, el cual también se relacionó y observó manifestaciones tóxicas al metabolizarse en condiciones de estrés oxido-reducción (Bhatt, Vyas, Singh, John, y Soni, 2018).

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) no ha encontrado evidencia suficiente para clasificar a la tartrazina-E102, en su lista, sin embargo, se ha incluido uno de sus probables metabolitos, la bencidina, en el grupo 1 (carcinogénico en humanos). Es necesario conocer que la bencidina es también uno de los metabolitos que pueden originarse por degradación de otros compuestos azoicos.

1.1.6. Metabolismo de la tartrazina y metabolitos

Según la IARC (2012) la bencidina también es un colorante obtenido de forma sintética, utilizado en el análisis de laboratorios clínicos para detección de sangre; y por otra parte, como composición del caucho, fundas plásticas, o para dar color a tejidos textiles, papel, cuero, etc.

La bencidina es considerada una impureza en los colorantes permitidos, y también es conocida como resultado del metabolismo hepático de los "azo-colorantes"

ingeridos en comidas con estos aditivos presentes, debido a degradan de estos por medio de reacciones de oxidación y reducción (Planelles Tomas, 1998).

Oxidación Metabólica: Proceso que ocurre mayoritariamente en colorantes insolubles en agua. Son catalizados por el citocromo P-540 presente en el hígado, quedando intacto el al grupo azo de la molécula colorante.

Reducción Metabólica: Proceso que ocurre mayoritariamente en colorantes solubles en agua. La enzima azorreductasa está representada por el citocromo P-540/NADPH, y se produce la ruptura del grupo azo presente en la molécula colorante.

Este último proceso, es uno de los más importantes porque los metabolitos obtenidos corresponden a aminas aromáticas o arilaminas, tales como la bencidina y anilina. Cabe destacar que el IARC estableció a estos metabolitos con riesgo como potencial carcinogénico para la salud humana.

1.6. BEBIDAS GASEOSAS.

La gaseosa, o bebida carbonatada, es una bebida saborizada, efervescente (carbonatada) y sin alcohol, obtenidas por disolución en agua potable del gas de CO₂. Estas bebidas suelen consumirse frías, para ser más refrescantes y para evitar la pérdida de dióxido de carbono, que le otorga la efervescencia. El agua con dióxido de carbono produce un equilibrio químico con el ácido carbónico. Algunos de los ingredientes más comunes son el agua carbonatada, que es la base esencial para la producción de cualquier gaseosa. En ciertos casos, primero se desmineraliza el agua, y luego se le agregan minerales en cantidades predeterminadas, aditivos, y edulcorantes según la norma INEN 1101 (2016) aplicada a bebidas gaseosas.

El Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en el proyecto de Encuesta Nacional de Salud y Nutrición ENSANUT (2014) se encarga de conocer la salud y nutrición de todo Ecuador en diferentes factores y casos, determinó en base a los resultados que el consumo de gaseosas es de un 84% en una población de niños y jóvenes hasta 14 años. Esto quiere decir que, este producto se consideraría de consumo masivo y habitual en la vida cotidiana, influenciando en la prevalencia del sobrepeso, ya que, de acuerdo con el proyecto referido, alrededor de 678.000

niños de 5 a 11 años tienen sobrepeso o son obesos, por lo tanto, el consumo de tartrazina como aditivo estaría altamente incluido en sus dietas.

1.7. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

La espectrofotometría es un término técnico y general, científicamente relacionado con la interacción de diferentes tipos de radiación con la materia. Desde el inicio se ha centrado el interés en las radiaciones electromagnéticas, pero hoy en día se ha ampliado las aplicaciones hacia diferentes tipos de energía interaccionando con la materia. La medición de la intensidad de la radiación llega a un detector diferente dependiendo de la aplicación al mismo. La radiación electromagnética es usada en casi la mayoría de los métodos espectrofotométricos, este tipo de energía se puede manifestar desde rayos gamma, rayos X, radiación lumínica, ultravioleta, infrarrojo, microondas y hasta radio frecuencia (Skoog y colaboradores, 2008).

El método se fundamenta en la obtención de una señal por medio de la transmitancia o la absorbancia de una solución. La concentración de un analito que absorbe la energía luminosa se relaciona según la ley de Beer de una forma en que se produzca una señal de tendencia lineal:

$$A = \varepsilon * c * l$$

En general los métodos ópticos espectroscópicos se apoyan en seis fenómenos:

1. Absorción
2. Fluorescencia
3. Fosforescencia
4. Dispersión
5. Emisión
6. Quimioluminiscencia

Los instrumentos típicos están compuestos por cinco componentes:

- 1) Fuente de energía radiante; 2) Recipiente de la muestra; 3) Selector de longitud de onda 4) Detector 5) Procesador de señal (Skoog et al., 2008)

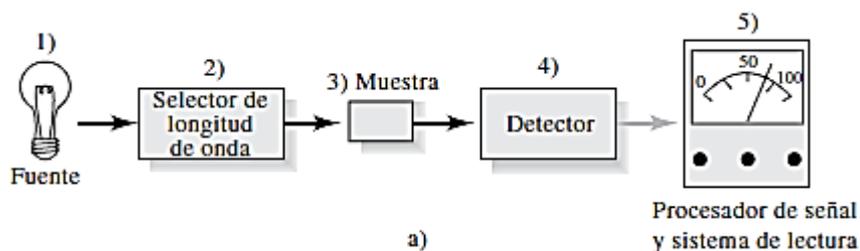


Figura 2 Configuración más usada en la composición de un espectrofotómetro.
Fuente: (Skoog y colaboradores, 2008)

Las mediciones con radiación ultravioleta pueden ser muy útiles para detectar diferentes grupos cromóforos. Esto se debe a que sobre el rango de 180 nm hay moléculas orgánicas que son transparentes, mientras que la aparición de uno o varios picos en la región de 200 a 400 nm es indicador de que pueden existir grupos insaturados de átomos como azufre, halogenados, etc. Así mismo un *auxocromo* es un grupo funcional que no absorbe por sí mismo en la región ultravioleta, pero que produce el efecto de desplazar los picos de los cromóforos hacia longitudes de onda más largas (Skoog et al., 2008)

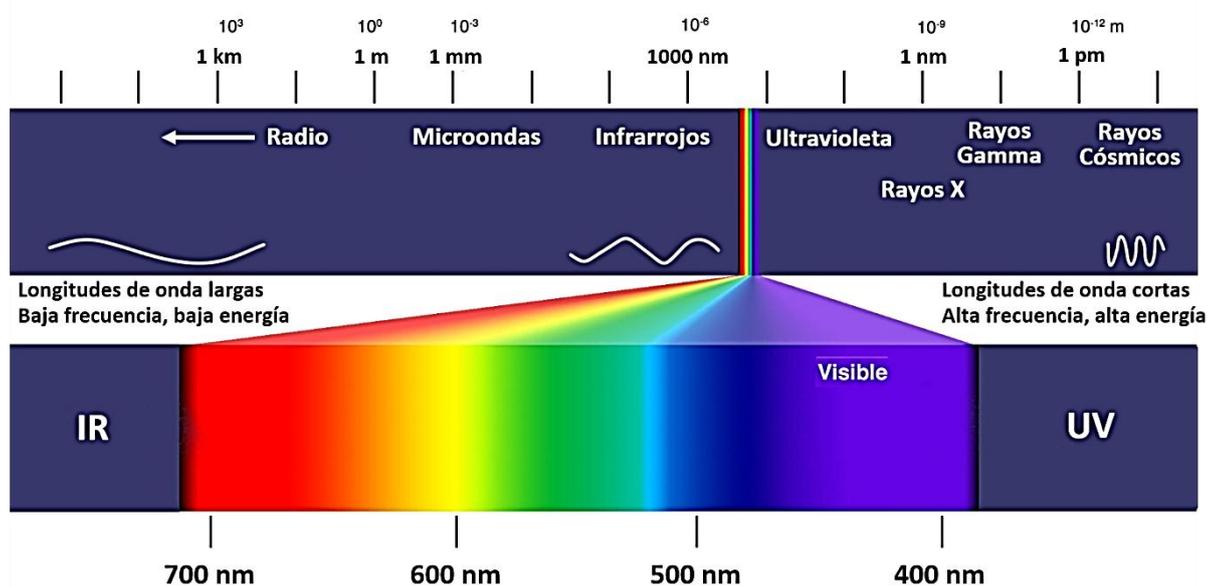


Figura 3 Espectro de absorción

Las aplicaciones de los métodos cuantitativos de absorción ultravioleta-visible no sólo son numerosas, sino que abarcan todos los campos en los que se requiere información química cuantitativa. (Skoog et al., 2008)

1.8. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

La cromatografía es un método de separación, identificación y determinación de componentes relacionados en una mezcla compleja. La muestra se disuelve en una fase móvil, este puede ser gas o líquido o un fluido supercrítico dependiendo del equipo; dicha muestra pasa con una alta presión a través de una fase estacionaria en el caso de la cromatografía de alta eficacia una columna que va a contener la fase estacionaria (Skoog y colaboradores, 2008).

La fase estacionaria se caracteriza por que va a retener los componentes de la muestra en distintos grados. Los analitos fuertemente retenidos en la fase estacionaria se moverán con lentitud en el flujo de la fase móvil con respecto a los que no lo están; estos componentes se separarán en bandas o zonas distintas para favorecer su análisis cualitativo y cuantitativo, por lo tanto se obtendrán diferentes velocidades de migración, que se denomina tiempo de retención (Skoog y colaboradores, 2008).

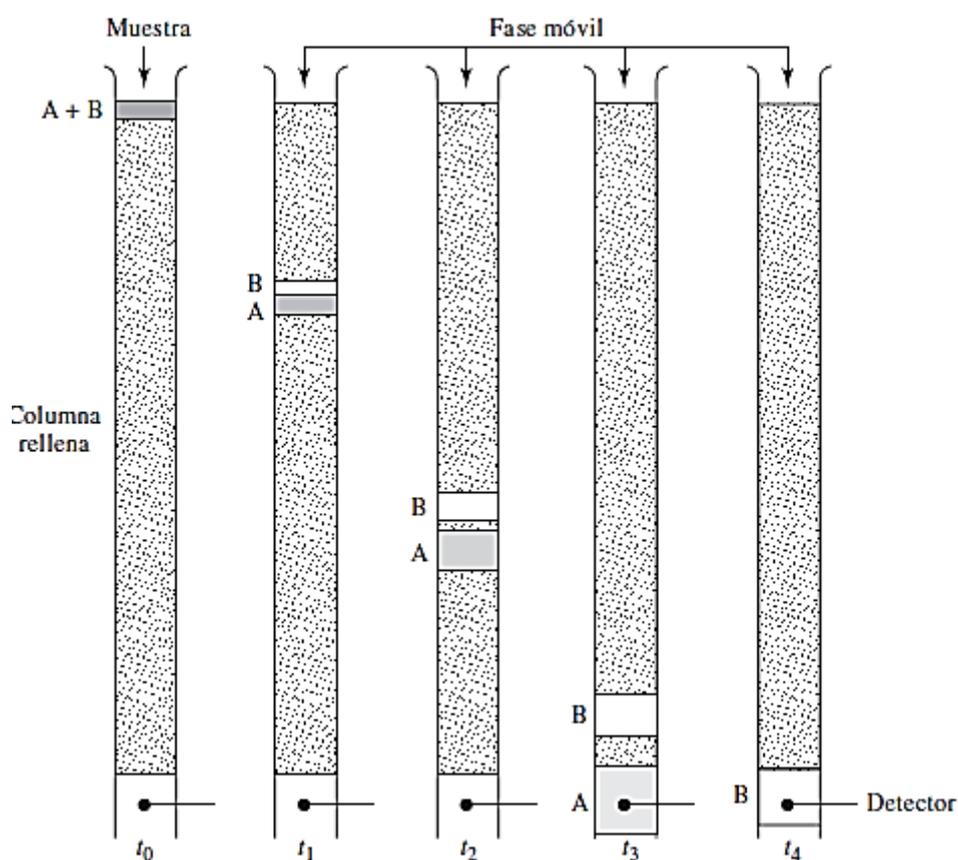


Figura 4 Separación de una muestra A y B por cromatografía de elución en columna.

Fuente: (Skoog et al., 2008)

A medida que la fase móvil fluye por la columna, esta transportará las moléculas de soluto retenidas hacia abajo de la columna entre una serie continua de transferencias entre la fase móvil y estacionaria. La velocidad de migración de un soluto dependerá de la fracción de tiempo que permanece en la fase estacionaria, de manera que estos componentes se separen en bandas a lo largo de la columna cuando ha pasado una suficiente cantidad de fase móvil, al final estas bandas son eluidas al extremo de la columna, recogidas y detectadas (Skoog y colaboradores, 2008).

Tipos de cromatografía:

- **Fase normal:** Fase solida es más polar que la fase móvil.
- **Fase reversa:** Fase estacionaria es menos polar que la fase móvil.
- **Intercambio iónico:** Fase estacionaria tiene grupos iónicos covalentemente unidos.
- **Filtración en gel:** Se fundamenta en el tamaño efectivo de las moléculas; de manera que las más pequeñas penetran los poros de la fase estacionaria, quedando retenidas a diferencia de las moléculas grandes.

Se puede lograr una mejor separación pasando de una elución isocrática a una de gradiente. La elución isocrática es aquella que usa una sola proporción de fase móvil durante todo el tiempo de análisis, mientras que la elución por gradiente se consigue de manera en que la composición de la fase móvil cambia con el tiempo. Estos cambios en la fase móvil permiten mejorar la resolución de los picos cromatográficos y acortar tiempos de elución de las especies que se retienen más fuertemente sobre la fase estacionaria (Rubinson, 2001).

La técnica de HPLC se utiliza en la mayoría de las investigaciones que tiene como objetivo identificar compuestos; se trata de un método estandarizado en el cual se analiza un patrón de referencia y así determinar por medio de la resolución de muestras sean menos o más complejas. Sin embargo, a pesar de ser un método estable y eficaz puede presentar un costo elevado frente a otras técnicas más sencillas, pero menos específicas. La descripción de la técnica no se basa solo en la instrumentación, además hay que ofrecer una aproximación sistemática para lograr separaciones adecuadas, sin dejar de mencionar un control en el proceso para conseguir los resultados correctos y satisfactorios (Rodríguez y colaboradores, 2014).

1.9. HPLC FRENTE A ESPECTROFOTOMETRÍA

Existe una variedad de métodos aplicados al análisis de colorantes en muestras de diferente índole; destacándose, por su carácter cuantitativo, las técnicas cromatográficas por HPLC y espectrofotométricas. Diversos estudios realizados con ambos instrumentos, aplican sistemas de detección en función de la absorbancia que registran los compuestos analizados en la zona del ultravioleta y visible, o con detección por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de alta eficacia o cromatografía gaseosa (Gianotti, Angioi, Gosetti, Marengo, y Gennaro, 2005).

En investigaciones realizadas por Alvarez, Matdonado, Gaggiotti, Caporgno, y Bedascarrasbure (2006) mencionan que "estadísticamente no existen grandes diferencias entre espectrofotometría UV y HPLC, según el tipo de muestra estudiada; sin embargo, una de las diferencias con el método de espectrofotometría visible, se obtiene valores considerablemente más altos que el HPLC, sin mencionar que también presenta una mayor variabilidad"; ello puede asociarse a la respuesta global que procuran los sistemas espectrofotométricos, siendo más específicos los instrumentos cromatográficos.

Para los análisis espectrofotométricos, es preciso conocer la longitud de onda ideal en la cual la señal obtenida será la máxima; para esto es necesario realizar o preparar una solución patrón del compuesto a analizar y, efectuar un barrido estableciendo la absorbancia de la molécula de interés (Gianotti y colaboradores, 2005).

En el caso del HPLC, de manera preliminar al análisis, se deben optimizar las condiciones analíticas del instrumento para cada uno de los componentes representativos del sistema, como es el inyector, bomba HPLC, y detector además de la fase móvil y fase estacionaria específicas para la adecuada resolución del pico del compuesto objeto de estudio. Los sistemas cromatográficos, a pesar de sus ventajas de precisión y exactitud, representan un costo más elevado que otros instrumentos más sencillos pero menos específicos a su vez; y requieren el manejo por parte de analistas capacitados para afrontar diversos inconvenientes que puedan suceder al momento de usar el equipo (Ortega y Guerra, 2006).

A pesar de las diferencias, ventajas y desventajas entre las características de estos dos sistemas instrumentales, es necesario mencionar su gran importancia

para el análisis químico, recalcando que, para el caso de la determinación de colorantes es relevante realizar estudios estadísticos comparativos que presenten evidencias claras y precisas, para su aplicación eficaz.

1.10 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

El término validación está directamente relacionado con la palabra calidad. En términos generales, la validación es una parte integral del desarrollo de un método analítico. La validación constituye el programa mediante el cual se establecen los requisitos óptimos para determinar, a través de parámetros estadísticos y ensayos, el alcance de un método, fundamentalmente en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad de los diferentes pasos que la componen. De hecho, pueden ser validados los métodos analíticos, los instrumentos, el personal etc., y en este sentido aumentan cada día más las exigencias a nivel internacional (Zumbado, 2004).

Según los métodos oficiales de análisis AOAC International (2016) un buen método analítico es necesario para obtener un estimado de concentración válido, pero aun así esto no será suficiente, por lo tanto es correspondiente realizar una validación del mismo en el cual se propone un planteamiento documentado para establecer las características de desempeño.

Tipos de validación:

- Validación retrospectiva: Métodos tradicionales empleados en el laboratorio que no ha sido normalizado.
- Validación prospectiva: Métodos recién creados (Sandoval, 2010).

Se debe Validar:

- Métodos no normalizados
- Método normalizado con una modificación significativa (ISO 17025, 2005).

Se debe Verificar:

- Métodos normalizados
- Métodos normalizados fuera del alcance propuesto
- Métodos normalizados o validados con algún cambio menor o poco significativo

Los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un método analítico y que deben ser determinados en el procedimiento de validación, según lo estipulado por diferentes organizaciones internacionales tales como: AOAC Codex Alimentarius; IUPAC y el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) son los siguientes.

1. Selectividad/Especificidad
2. Intervalo de Trabajo
 - a. Linealidad
3. Exactitud
 - a. Veracidad o Justeza
4. Precisión
 - a. Repetibilidad
 - b. Reproducibilidad
5. Sensibilidad de calibrado
6. Límite de detección
7. Límite de cuantificación
8. Robustez

En la siguiente tabla se presentan parámetros de validación recomendados para aplicación según el tipo de método analítico.

Tabla 2 Parámetros de Validación aplicados a diferentes métodos

Parámetro a evaluar	Características	Método cualitativo	Método cuantitativo		
			Normalizado	Modificado	Nuevo
Selectividad	Identificación analito Interferencia de matriz	Si	No es obligatorio	Si	Si
Linealidad	Rango Lineal	No	Si	Si	Si
Sensibilidad	Pendiente (m)	No	No es obligatorio	Si	Si
Limites	Critico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Si	No es obligatorio	Si	Si
Precisión	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Si	Si	Si
Veracidad	Sesgo (s) Recuperación ®	No	Si	Si	Si
Robustez	Test de <i>Youden</i> y <i>Steiner</i>	No	No	No es obligatorio	Si
Aplicabilidad		Si	Si	Si	Si

SELECTIVIDAD.- La selectividad o especificidad se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra (Zumbado, 2004).

- Se prepara una muestra que contiene los componentes usualmente presentes en la muestra o matriz original (por ejemplo, un alimento), pero que no contenga el analito; esto es lo que se denomina matriz blanco. Se procede a la determinación del analito en las condiciones del método evaluado. De forma ideal, ninguno de los componentes presentes debe producir una respuesta cuantificable.
- Se prepara una muestra con un patrón del analito y un componente de las posibles impurezas. Se realiza la cuantificación y se comparan los resultados con una muestra que solo contiene patrón del analito. En este caso hay que aplicar pruebas estadísticas.

LINEALIDAD. - Este se da dentro de un intervalo, un punto menor a uno mayor en el cual por medio de los cálculos de regresión lineal se podrá observar si los resultados son proporcionales a la concentración del analito de interés en la respectiva muestra (Sandoval, 2010).

Para determinar la linealidad se realiza una curva donde se relaciona e interpola la concentración y señal analítica, este procedimiento se conoce como “curva de calibración” o “curva de calibrado”. Esta curva está construida en base, como mínimo, a cuatro puntos de concentraciones proporcionales y en aumento. Se trabaja con el estándar respectivo del analito de interés que deben estar con sus respectivos certificados de análisis (Sandoval, 2010).

SENSIBILIDAD DEL CALIBRADO. - La sensibilidad de calibrado (S) se define como el coeficiente diferencial entre la señal medida (respuesta del método) y la concentración del analito. En una regresión lineal corresponde a la pendiente (Sandoval, 2010).

LÍMITE DE DETECCIÓN. - Cantidad real del analito presente en la muestra de estudio, en la cual la concentración del analito en la muestra es mayor al del blanco de la matriz (Sandoval, 2010).

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN. - El límite de cuantificación (o determinación) es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser determinada o cuantificada con aceptable precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas (Zumbado, 2004). Esta será la señal del valor verdadero de la medición en el cual se podrá usar los datos para generar resultados en la cuantificación (Sandoval, 2010).

PRECISIÓN. - Es el grado de correlación o cercanía entre los resultados analíticos individuales que se obtienen al aplicar repetidamente el método a varias muestras, de una homogénea común (Zumbado, 2004).

La precisión puede expresarse en dos niveles:

- **Repetibilidad:** Es la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.
- **Reproducibilidad:** Es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones.

EXACTITUD. - La Exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible a un valor verdadero (ICH, 2005).

VERACIDAD. - La veracidad o justeza indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena.

La veracidad se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero (Zumbado, 2004).

La determinación del porcentaje de recuperación se puede llevar a cabo a través de tres procedimientos:

- Análisis repetido de una muestra de concentración única conocida
- Método de adición de patrón
- Comparación con otro método analítico ya validado.

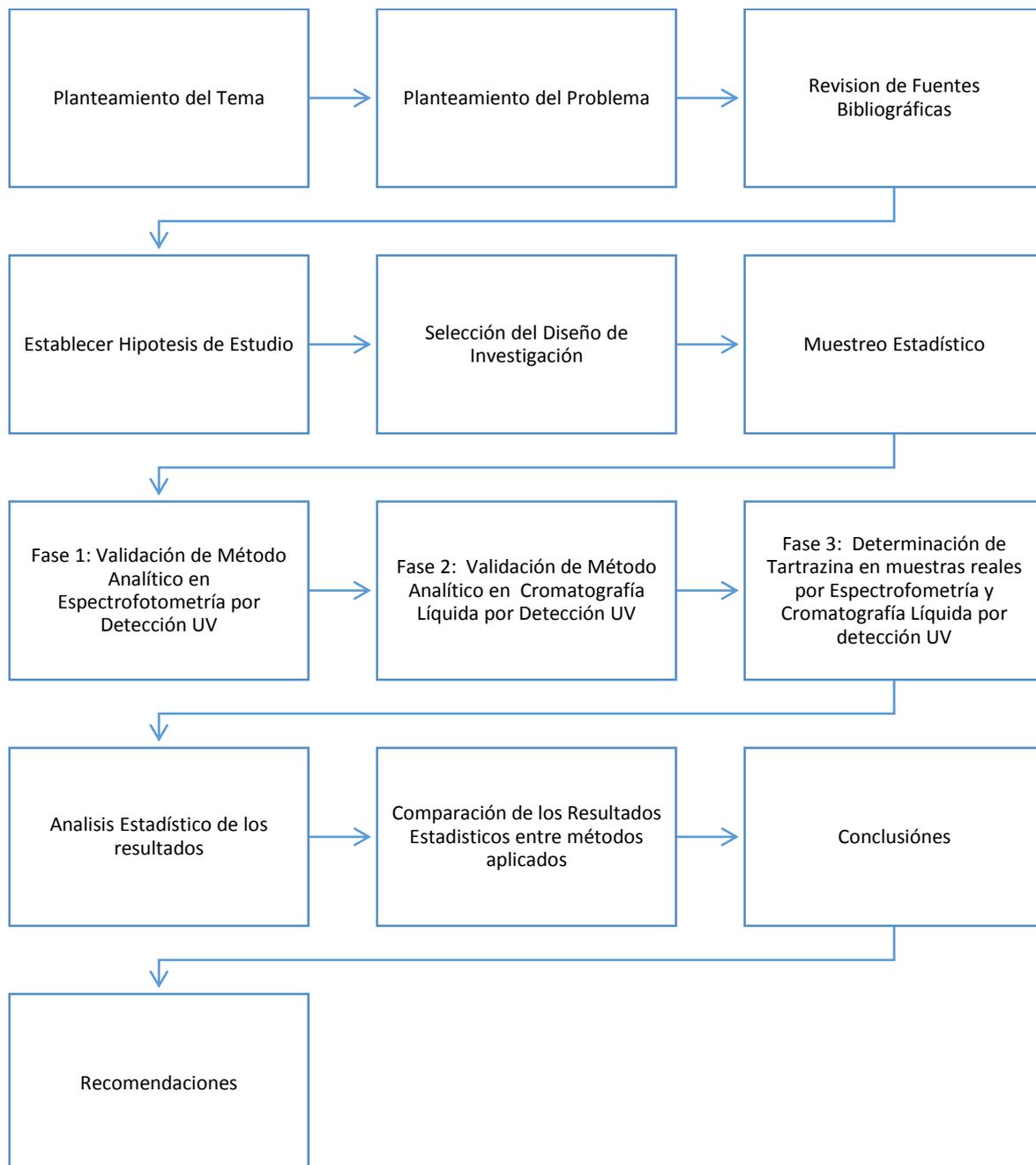
Según Sandoval (2010), también es posible determinar la veracidad por medio del sesgo, el cual será la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero.

ROBUSTEZ. - El estudio de robustez investiga la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico, localizando los factores que originan fluctuaciones menores y los que necesitan una atención especial por cuanto originan variaciones significativas (Zumbado, 2004).

CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. METODOLOGÍA

Tabla 3 Metodología de investigación



2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIO

Investigación Descriptiva: Relaciona conceptos o variables

Experimental: Se determinó tartrazina por 2 metodologías analíticas diferentes, cromatografía líquida y espectrofotometría por detección ultravioleta.

Prospectivo: Los datos obtenidos pueden usarse en investigaciones futuras.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.1. Recolección de muestras

Las muestras consideradas para este estudio correspondieron a:

- Bebidas gaseosas sin tartrazina, para muestra control con las que se realizaron los ensayos para validación de los métodos. Se prefieren las bebidas gaseosas incoloras.
- Bebidas gaseosas que declaren tartrazina en su etiquetado, como muestras reales para aplicación de los métodos validados.

La selección y recolección de muestras de bebidas gaseosas se realizó por medio de un muestreo aleatorio simple, y por ser muestras que en su análisis no se recuperan, se eligieron 8 bebidas gaseosas por duplicado tomadas de percha de un centro de venta masivo de productos alimenticios y de tiendas locales.

Las muestras de bebidas gaseosas se tomaron—con los siguientes criterios inclusión:

- ✓ Marca
- ✓ Diferente número de Lote

Las muestras seleccionadas fueron analizadas tanto por el sistema de HPLC, así como por el sistema de espectrofotometría.

2.3.2. Equipos y reactivos

Equipos:

- Espectrofotómetro UV-Vis THERMO HEXIUS B
- Espectrofotómetro MELTER TOLEDO GENESYS 10S UV-VIS
- Cromatógrafo de líquidos con detector UV HITACHI LACHROM ELITE
- Baño ultrasónico Branson 2800

Reactivos:

- Agua HPLC (tipo 1)
- Metanol J.T BAKER, grado HPLC
- Acetonitrilo J.T BAKER, grado HPLC
- Acetato de amonio MERCK, grado reactivo
- Acetato de sodio MERCK, grado reactivo
- Sustancia patrón de Tartrazina SIGMA ALDRICH, 99% de pureza,

2.3.3. Validación de un método analítico por espectrofotometría con detección UV-VIS.

SELECTIVIDAD- ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LA TARTRAZINA.

1. Preparar una solución madre o stock disolviendo 25mg del estándar con agua destilada en un matraz aforado de 100 mL.
 - 1) Realizar el ajuste de pureza del estándar
 - 2) Pureza: 99,1%
 - 3) Pureza para cada nivel de concentración con el ajuste:
 - 6 = 5,946
 - 12 = 11,892
 - 18 = 17,838
 - 24 = 23,784
 - 36 = 35,676
2. Preparar una disolución tampón de acetato de amonio alrededor de un pH = 6,5 - 7,5. Esta solución garantiza que el pH se mantenga constante.
3. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución stock más 2 mL de la solución tampón y adicionarlo en un matraz de 10 mL; enrasar con agua destilada.
4. Realizar un barrido en el espectrofotómetro desde 200 nm a 500 nm, con rango de diferencia de 1nm.
5. Observar la curva de absorbancia vs longitud de onda con los datos obtenidos respectivamente.
6. Seleccionar la lectura de mayor nivel ideal para tartrazina.

LINEALIDAD

Curva de calibración

1. Preparar, a partir de la solución madre o stock, cinco diluciones por triplicado en concentraciones distintas de 6, 12, 24, 36, 48 mg·L⁻¹ adicionando también 2 mL de la solución tampón.

2. Leer cada una de las disoluciones a la longitud de onda óptima obtenida y por cada nivel de concentración. Leer desde la solución de menor concentración hacia la de mayor concentración.
3. Elaborar un gráfico de concentración vs absorbancia.

De los datos de la curva de calibración obtenida.

1. Efectuar el análisis de regresión lineal.
2. Determinar la proporcionalidad existente entre la concentración y la lectura obtenida, calculando por el método de ajuste de mínimos cuadrados de la ecuación de regresión lineal. Se calcula con la siguiente formula:

- $y = a + bx$
- $a = y - bx$
- $b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$

Dónde:

- Intercepto (a)
 - Pendiente (b)
 - Concentración (x)
 - Respuesta del método (y)
3. Determinar el coeficiente de correlación ($r > 0.99$).
 4. Determinar el coeficiente de determinación ($r^2 > 0.99$).

ESTUDIO EFECTO MATRIZ

Método "adición de estándar":

1. Seleccionar una muestra que no contenga el analito de estudio y posibles interferentes (muestra blanco).
2. Tomar alícuotas de la solución madre para preparar concentraciones de 6, 12, 18, 24, 36 mg·L⁻¹ y llevar a volumen con las muestras blanco.

3. Leer cada una a la longitud de onda óptima obtenida y por cada nivel de concentración. Leer las muestras de menor a mayor concentración.
4. Elaborar un gráfico de concentración vs absorbancia.
5. Determinar la ecuación de la recta
6. Relacionar si el resultado obtenido vs el estándar con agua destilada presenta algún cambio significativo caso contrario realizar un ajuste estadístico.

SENSIBILIDAD DEL CALIBRADO

Al ser una calibración lineal, la sensibilidad del calibrado debe coincidir con la pendiente (m) de la recta de calibración. En este caso, se procedió a indicar la capacidad de respuesta del método analítico por medio de la siguiente fórmula.

$$S = \frac{\text{Respuesta del método}}{\text{Concentración de analito}}$$

DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La determinación del límite de detección y del límite de cuantificación se ensaya en muestras sin el analito de interés, esto quiere decir que tiene la misma matriz. Se calculó con los datos de la regresión lineal obtenidos en el estudio de efecto matriz. Las muestras serán analizadas por triplicado.

El criterio de aceptación es $LOD < LOQ < LMP$.

$$LD = \frac{y_{bl} + 3 \times S_{bl}}{b}$$

- Y_{bl} = Señal promedio del blanco
- S_{bl} = Desviación estándar del blanco
- b = Pendiente obtenida desde la regresión lineal del analito.
- LD = Límite de detección

$$LC = \frac{y_{bl} + 10 \times S_{bl}}{b}$$

- Y_{bl} = Señal promedio del blanco
- S_{bl} = Desviación estándar del blanco
- b = Pendiente obtenida desde la regresión lineal del analito
- LC = Limite de cuantificación

EXACTITUD

Realizar el análisis a tres niveles de concentración en matrices contaminadas o fortificadas con el analito de interés. Estas concentraciones representan niveles bajo, medio y alto en el orden de 5.946, 17.838 y 35.676 mg·L⁻¹. Los valores propuestos se seleccionan en base a ensayos previos en muestras blanco.

El porcentaje de recuperación se determinó utilizando para el cálculo la curva de calibración que denota la linealidad del compuesto en la matriz obtenida en el mismo día de análisis.

El criterio para aceptación de los valores de recuperación que brinda el método, se basa en lo dispuesto por la AOAC de acuerdo al nivel de concentración de las muestras fortificadas; esta información se incluye en el **Anexo 2** de este documento. Para determinar el porcentaje de recuperación se usará la siguiente formula:

$$\%Recuperaci\grave{o}n = \frac{Valor\ obtenido\ (\bar{X})}{Valor\ real} \times 100$$

PRECISIÓN

1. La precisión relaciona dos parámetros: repetibilidad y reproducibilidad.

a) Repetibilidad:

- Realizar ensayos de recuperación en muestra control por triplicado a tres niveles de concentración, considerando un intervalo de tiempo corto, mismo analista y mismo laboratorio, para el análisis de dichas muestras.

b) Reproducibilidad:

- Realizar ensayos de recuperación en muestra control por triplicado a tres niveles de concentración, considerando el análisis en tres días distintos.

2. Calcular la precisión de los datos obtenidos en la repetibilidad y reproducibilidad con las siguientes formulas:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100$$

CV: Coeficiente de variación

S: Desviación estándar

X: Media

3. "S" es un parámetro estadístico que expresa la desviación de los valores con respecto al valor medio y puede calcularse a través de la siguiente expresión anota. Se debe tomar en cuenta que mientras el CV sea menor, significará que tendrá mejor precisión el método. Se puede considerar aceptable, en este caso un valor de $CV < 3\%$ para métodos espectrofotométricos (Zumbado, 2004)

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

2.3.4. Preparación y lecturas de la muestra espectrofotométría:

1. Desgasificar la muestra en baño de ultrasonido por 15 min.
2. Ajustar el pH con la solución tampón.
3. Realizar las lecturas por triplicado sin dilución frente al estándar de tartrazina.
4. Por medio de la ecuación de la recta hallar la concentración final de las muestras

2.3.5. Validación de un método analítico por cromatografía con detección UV.

SELECTIVIDAD

La prueba de selectividad pudo diseñarse de acuerdo al método, en el caso de cromatografía la resolución entrega información sobre la selectividad del método. Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los testigos reactivos, blancos de matrices y estándares o muestras con analito (Sandoval, 2010).

1. Realizar la inyección a tres niveles de concentración del estándar de tartrazina
2. Realizar la inyección de una muestra elegida al azar que contenga tartrazina
3. Comparar los tiempos de elución y observar si existe alguna diferencia significativa

LINEALIDAD

Preparar de la solución madre o stock 5 diluciones por triplicado en concentraciones distintas 6, 12, 18, 24 y 36 mg L⁻¹

De los cromatogramas obtenidos por cada concentración se elaborará una curva representando la concentración vs el área del pico

1. Efectuar el análisis de regresión lineal.
2. Determinar la proporcionalidad existente entre la concentración y la lectura obtenida, calculando por el método de ajuste mínimos cuadrados de la ecuación de regresión lineal. Se calcula con la siguiente formula:

- $y = a + bx$
- $a = y - bx$
- $b = \frac{\sum(xi-x)(yi-y)}{\sum(xi-x)}$

Dónde:

- Intercepto (a)
- Pendiente (b)

- Concentración (x)
 - Respuesta del método (y)
3. Determinar el coeficiente de correlación ($r > 0.99$).
 4. Determinar el coeficiente de determinación ($r^2 > 0.99$).

SENSIBILIDAD DEL CALIBRADO

Al ser una calibración lineal, la sensibilidad del calibrado coincidirá con la pendiente (m) de la recta de calibración.

1. Indicar la capacidad de respuesta del método analítico por medio de la siguiente fórmula.

$$S = \frac{\text{Respuesta del método}}{\text{Concentración de analito}}$$

DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para la determinación de los límites se realizó la dilución del estándar hasta que este ya no sea detectable (llegando a la señal ruido) este factor se lo multiplicará por 3 para límite de detección y luego por 10 para límite de cuantificación con su respectiva integración en la ecuación de la recta para conocer la concentración de los límites.

EXACTITUD

Realizar el análisis en 3 niveles de concentración de matrices contaminadas o fortificadas con el analito de interés estos niveles representaran un bajo, medio y alto: 5.946, 17.838 y 35.676 mg·L⁻¹ el cual fueron seleccionados por ensayos previos de las muestras.

Se determinará el porcentaje de recuperación usando las curvas de calibración de las matrices contaminadas, que se realizó en el mismo momento. El criterio de aceptación para recuperación se basará en el cuadro dispuesto según AOAC para el nivel de

fortificación realizada, esta se contempla en el **Anexo 2**. Para determinar el porcentaje de recuperación se usó la siguiente fórmula:

$$\%Recuperaci\grave{o}n = \frac{Valor\ obtenido\ (\bar{X})}{Valor\ real} \times 100$$

PRECISIÓN

1. La precisión se relaciona con 2 niveles, repetibilidad y reproducibilidad.

a) Repetibilidad:

- 1) Realizar tres inyecciones réplicas en tres niveles de concentración todas bajo las mismas condiciones y en un intervalo de tiempo corto, por el mismo analista y laboratorio.

b) Reproducibilidad:

- 1) Realizar tres inyecciones del nivel aproximado al 100% de las muestras ($18\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 días distintos por diferentes analistas y en las mismas condiciones y laboratorio.

2. Calcular la precisión de los datos obtenidos en la repetibilidad y reproducibilidad con las siguientes fórmulas:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100$$

CV: Coeficiente de variación

S: Desviación estándar

X: Media

3. De igual manera que espectrofotometría se determinó el %CV, para métodos cromatográficos serán de <2%.

2.3.6. Preparación y lectura de la muestra por HPLC

ANÁLISIS PRELIMINARES

Se realizó una serie de análisis pre-eliminarios en el cual se seleccionó diferentes criterios cromatográficos para determinar el comportamiento del analito en diferentes condiciones analíticas, esto sirvió para optimizar el método a emplear.

- a) Se utilizó diferentes proporciones de fase móvil, desde la inicial obtenida bibliográficamente por Alves, Brum, Branco de Andrade, y Pereira (2008) y optimizando la misma desde un mayor contenido orgánico hasta uno acuoso.
 - Solución A Metanol HPLC
 - Solución B Solución Buffer
 - Solución C Agua grado HPLC
 - Solución D Acetonitrilo HPLC

- b) Con el fin de observar picos más simétricos y de tendencia Gaussiana si la fase móvil usada bibliográficamente no es la adecuada se procedió a tantear hasta lograr una que sea adecuada al método lo cual incluye modificación de la fase móvil, horno de la columna, flujo, pH, columna.

- c) Por último, se inyectó una muestra en una elución isocrática con las condiciones elegidas para observar el comportamiento de la señal obtenida y concluir si con los previos análisis preliminares es viable aplicar el método obtenido.

Por último, una vez obtenidas las condiciones cromatográficas se procedió a la preparación de la muestra para su respectiva lectura:

1. Desgasificar la muestra en baño de ultrasonido.
2. Realizar las diluciones correspondientes si es necesario.
3. Filtrar la muestra con un filtro HPLC.
4. Realizar las lecturas por triplicado sin dilución o diluidas. No se realiza dilución alguna en la muestra, se inyecta directo.
5. Realizar los cálculos de las áreas de los picos frente al estándar de tartrazina.
6. Determinar la concentración de tartrazina presente en las muestras reales.

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. RESULTADOS ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

3.1.1. Selectividad

Espectro de absorción de la tartrazina

Se realizó un barrido espectral en dos diferentes espectrofotómetros, las variables usadas fueron las descritas en el punto 2.3.3 en el cual la longitud de onda inicial fue de 200 nm y la final de 500 nm, con 1 nm de diferencia entre lectura a una altura máxima de 3.320 de absorbancia, los resultados se representarán en un gráfico mostrando los picos de las absorbancias máximas con sus respectivas correcciones de fondo y suavizados de la señal.

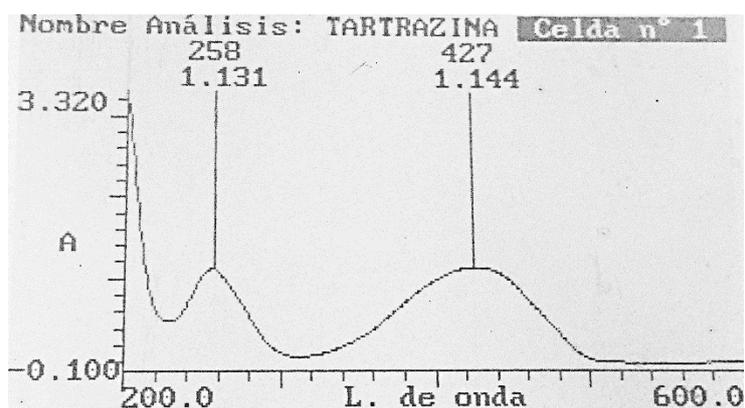


Figura 5 Barrido espectral obtenido mediante espectrofotómetro en el rango de 200 – 600 nm (equipo Melter Toledo Genesys 10s Uv-Vis)

La mayor señal obtenida como se observa en la **Figura 5** fue a 258 nm y 427 nm correspondiente a 1.131 y 1.144 de absorbancia respectivamente.

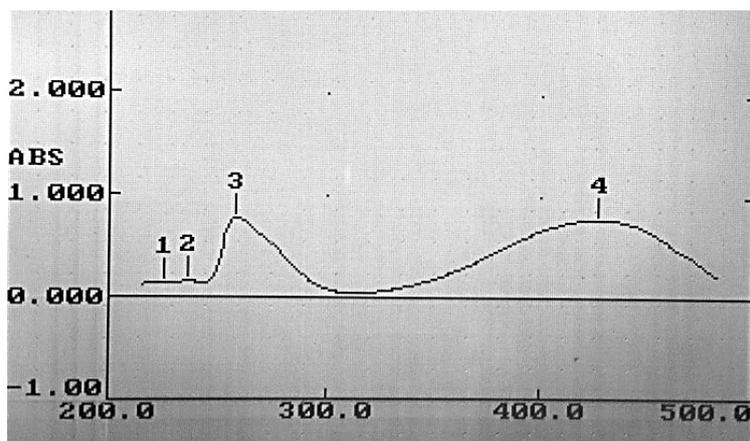


Figura 6 Barrido espectral obtenido mediante espectrofotómetro en el rango de 200 – 500 nm Thermo Hexios B Uv- Vis

La mayor señal obtenida como se observa en la **Figura 6** fue a 258 nm y 427 nm correspondiente a 0.792 y 0.790 de absorbancia respectivamente.

En una comparación de los dos barridos las mejores señales se dieron a los 258 nm y 427 nm, en ambos espectros. De acuerdo con la **Figura 5**, la mejor señal fue a los 427 nm y en la **Figura 6**, lo fue a los 258 nm. Pero por resolución del pico y acorde a los resultados preliminares, se estableció que la longitud de onda óptima es a los 427nm.

3.1.2. Linealidad

Para la determinación de la linealidad se prepararon cinco soluciones estándar a concentraciones de 6, 12, 24, 36, 48 mg·L⁻¹, como se indica en el punto **2.3.3**, se realizaron tres análisis de cada concentración a una longitud de onda de 427 nm cada lectura por triplicado obteniendo los siguientes resultados:

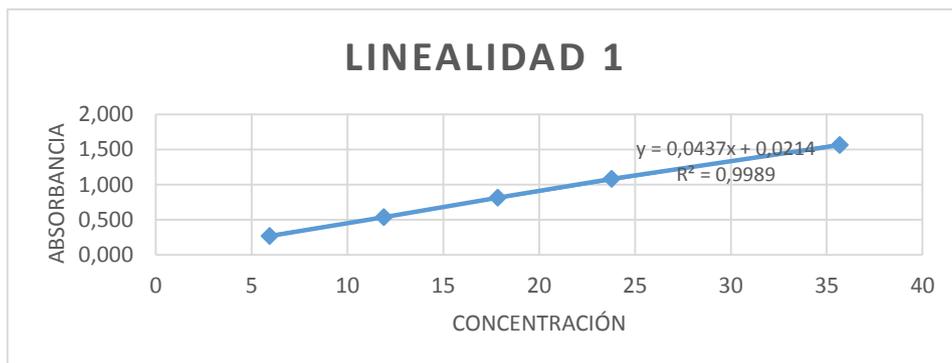


Figura 7 Curva de calibración 1 linealidad

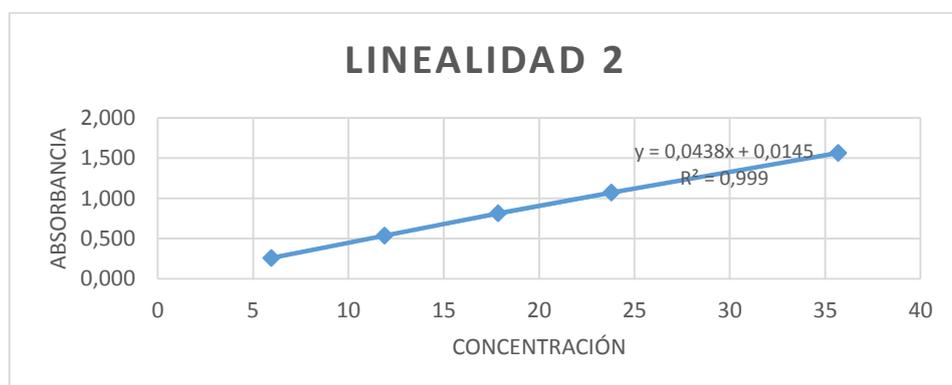


Figura 8 Curva de calibración 2 linealidad

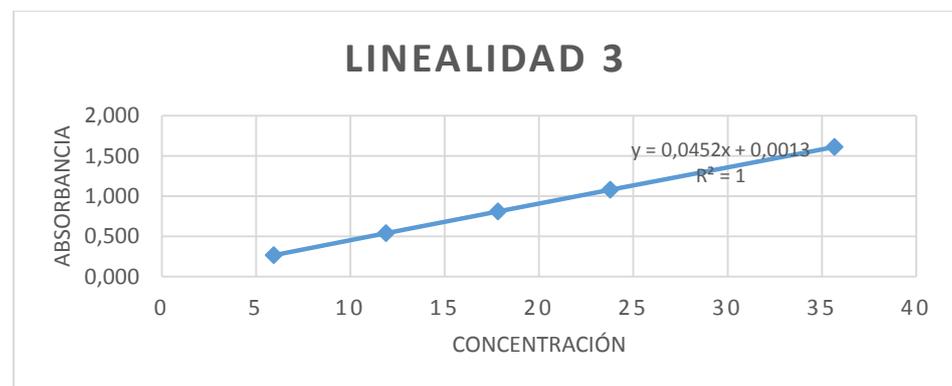


Figura 9 Curva de calibración 3 linealidad

Las absorbancias las curvas de calibraciones se encuentran definidas en el **Anexo 4** a continuación se elaboró un promedio de todas las absorbancias obtenidas de las diferentes curvas de calibración realizadas para la determinación de la linealidad.

Tabla 4 Linealidad del sistema de la tartrazina

Concentración (mg/L)	\bar{X} Figura 7	\bar{X} Figura 8	\bar{X} Figura 9	Promedio	S	%CV	Varianza
5.946	0.268	0.259	0.268	0.265	0.0052	1.96	0.00003
11.892	0.537	0.536	0.540	0.538	0.0021	0.39	0.00000
17.838	0.817	0.813	0.809	0.813	0.0040	0.49	0.00002
23.784	1.082	1.073	1.079	1.078	0.0046	0.43	0.00002
35.676	1.567	1.563	1.613	1.581	0.0278	1.76	0.00077

Las absorbancias presentadas en la **Tabla 4** fueron calculadas estadísticamente por medio del programa Microsoft Excel en el cual se determinó el factor de respuesta del método (X/Y), el promedio de los factores, la desviación estándar (s), varianza (s²) y el coeficiente de variación (CV%). Todos estos datos correspondientes a la curva de calibración elaborada a partir de los datos obtenidos como se muestra en la **Figura 10** a continuación:

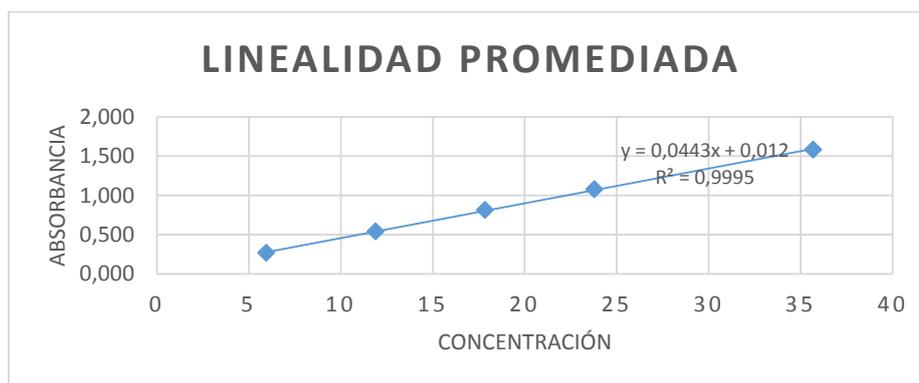


Figura 10 Curva de calibrado a 5 diferentes concentraciones de la tartrazina

Evaluación de la curva de calibración promediada:

Prueba T-student

Se medirá las medias de los datos obtenidos para demostrar diferencias estadísticamente significativas, t con n-2 grados de libertad y se compara con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0.05$), dos-colas, en este caso para un “n” que depende de los niveles de calibración (Sandoval, 2010):

$$T_r: \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Donde:

- t_r = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación
- $|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación
- n-2 = Número de grados de libertad
- r^2 = Valor del coeficiente de determinación

En este caso se evaluó con la hipótesis de significancia en la correlación x/y:

H_0 : No existe correlación entre x/y

H_1 : Existe correlación entre x/y

Si el valor de $t_r > t_{\text{critico}}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, habrá significancia en la correlación lineal con la probabilidad calculada.

$$T_r: \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} = \frac{|0,9997| * \sqrt{(5-2)}}{\sqrt{(1-0.9995)}} = 77.4209$$

Coefficiente de determinación	0.9995
Coefficiente de correlación	0.9997
Observaciones (número de niveles)	5
Grados de libertad	3
T calculado	77.4209
T critico	3.182

El valor de t_r es mayor al de t_{crit} es decir $77.4209 > 3.182$ por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H_0) siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

Se obtuvieron resultados aceptables de los análisis de la regresión lineal de la tartrazina, tanto el coeficiente de correlación y determinación fueron mayores a 0,99 por lo tanto cumple con el criterio de aceptación, que para ambos casos debe ser $> 0,99$.

3.1.3. Efecto Matriz

Se realizó los mismos ensayos que en linealidad solo que esta vez se realizó una contaminación de un blanco de matriz (fortificación):

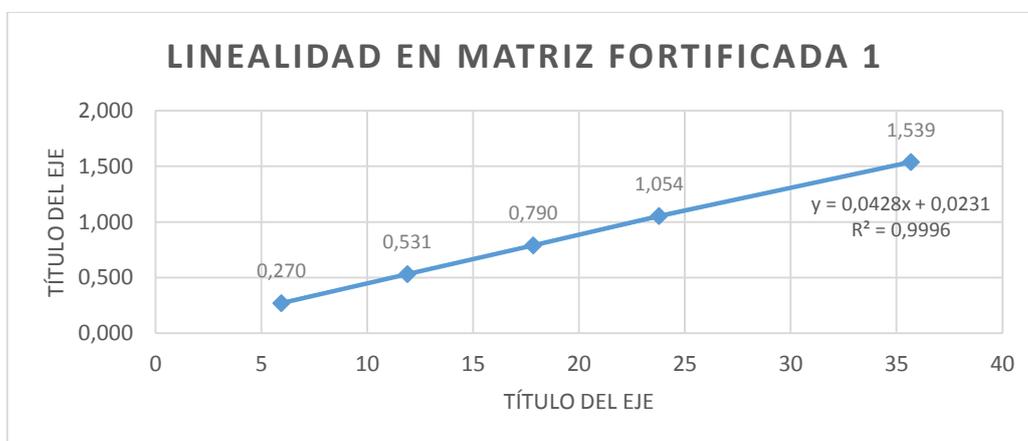


Figura 11 Curva de calibración 1 "Fortificada"

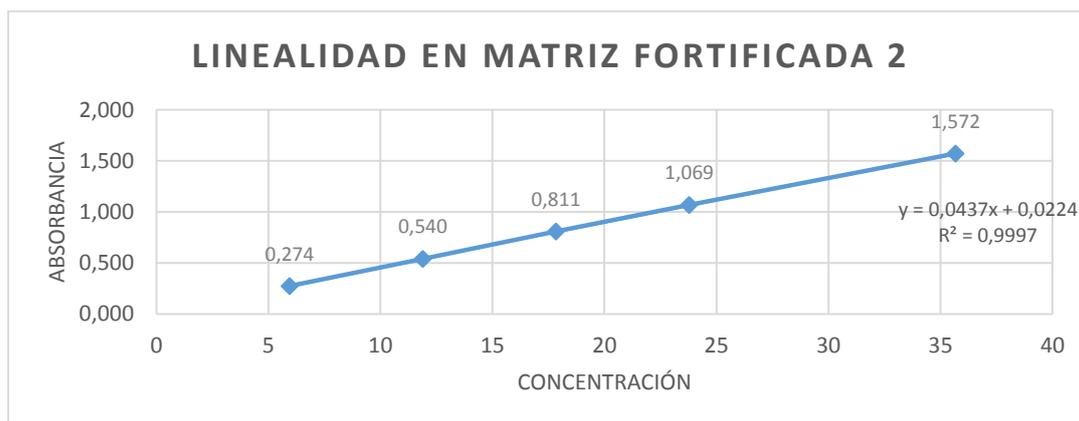


Figura 12 Curva de calibración 2 "Fortificada"

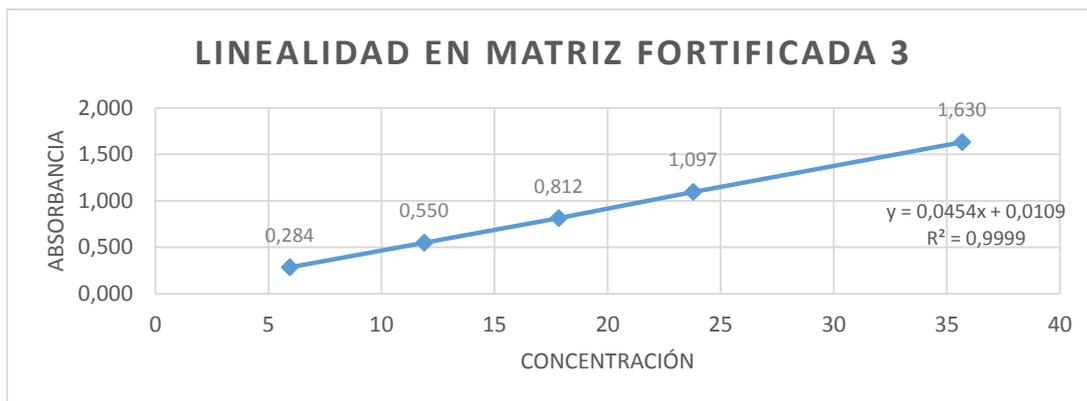


Figura 13 Curva de calibración 3 "Fortificada"

Las absorbancias las curvas de calibraciones se encuentran definidas en el **Anexo 5** a continuación se elaboró un promedio de todas las absorbancias obtenidas de las diferentes curvas de calibración realizadas para la determinación de la linealidad.

Tabla 6 Linealidad de la tartrazina en matriz contaminada

Concentración (mg/L)	\bar{X} Figura 11	\bar{X} Figura 12	\bar{X} Figura 13	Promedio	S	%CV	Varianza
5.946	0.27	0.274	0.284	0.276	0.0072	2.61	0.00005
11.892	0.531	0.554	0.55	0.540	0.0095	1.76	0.00009
17.838	0.79	0.811	0.812	0.804	0.0124	1.54	0.00015
23.784	1.054	1.069	1.097	1.073	0.0218	2.03	0.00048
35.676	1.539	1.572	1.63	1.580	0.0461	2.91	0.00212

Las absorbancias presentadas en la **Tabla 6** fueron calculadas estadísticamente por medio del programa Microsoft Excel en el cual se determinó el factor de respuesta del método (Y/X), el promedio de los factores, la desviación estándar (s), varianza (s²) y el

coeficiente de variación (CV%). Todos estos datos correspondientes a la curva de calibración elaborada a partir de los datos obtenidos como se muestra en la **Figura 14** a continuación:

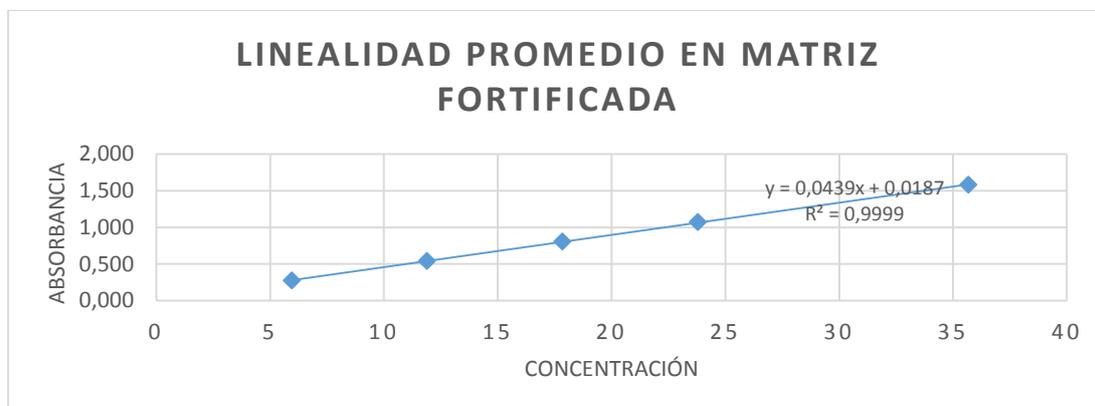


Figura 14 Linealidad global de la tartrazina en matriz Fortificada

En este caso se evaluó con la hipótesis de significancia en la correlación x/y:

H₀: No existe correlación entre x/y

H₁: Existe correlación entre x/y

Si el valor de $t_r > t_{\text{critico}}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, habrá significancia en la correlación lineal con la probabilidad calculada.

$$T_r: \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} = \frac{|0,9999| * \sqrt{(5-2)}}{\sqrt{(1-0,9999)}} = 173.1877$$

Tabla 7 Prueba T-student linealidad

Coefficiente de determinación	0.9999
Coefficiente de correlación	0.9999
Observaciones (número de niveles)	5
Grados de libertad	3
T calculado	173.1877
T critico	3.182

El valor de t_r es mayor al de t_{crit} es decir $173.1877 > 3.182$ por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H_0) siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

El valor obtenido similar al del blanco de agua destilada, por lo tanto, la matriz de las bebidas gaseosas no induce un cambio significativo en los resultados de los análisis.

3.1.4. Sensibilidad del calibrado

Como se explicó en el punto 3.3.3 la sensibilidad corresponde directamente al valor de la pendiente (m) de la curva de calibración global.

$$S = \frac{\text{Respuesta del método}}{\text{Concentración de analito}} = \frac{\sum \text{Señal analítica}}{\sum \text{Concentraciones}} = 0.0443$$

Mientras más cercano estén los valores al eje de las "Y" habrá más variabilidad en los resultados de las lecturas; esto quiere decir que, si el método es más sensible, un cambio mínimo de concentración provocara mayor variación en los resultados. La respuesta instrumental se midió con la sensibilidad obtenida, es decir, se determinó el comportamiento del instrumento frente a una concentración de analito.

3.1.5. Límite de detección y cuantificación

Se realizó tres mediciones del blanco matriz (matriz sin el analito presente) frente al blanco de agua destilada, por medio de los datos de la regresión lineal obtenidos de la curva de calibración promedio de la matriz fortificada. Se procedió a calcular su límite de detección:

Tabla 8 Datos de la señal blanco

Señal del blanco	0.001
	0.000
	-0.001
Promedio	0.000
Desviación estándar	0.001
m	0.0439

$$LD = \frac{y_{bl} + 3 \times S_{bl}}{b} = \frac{(3 * 0.001)}{0.0464} = 0.0395 \text{ mg/L}$$

$$LC = \frac{y_{bl} + 10 \times S_{bl}}{b} = \frac{(10 * 0.001)}{0.0464} = 0.1315 \text{ mg/L}$$

Según los resultados de los ensayos realizados, los límites cumplen con el criterio de aceptación, $LOD < LOQ < LMP$: $0.0395 \text{ mg/L} < 0.1315 \text{ mg/L} < 200 \text{ mg/kg}$

3.1.6. Exactitud:

Veracidad o justeza

Se determinó por medio del porcentaje de recuperación obtenido de matrices fortificadas, esto permitió determinar el rendimiento que tenga el método analítico. Se realizó tres réplicas a tres diferentes niveles de concentración en la matriz fortificada con tartrazina.

Tabla 9 Porcentaje de recuperación obtenido

Concentración T	Absorbancia			Prom.	Concentración	% de recuperación
5.946	0.27	0.274	0.284	0.276	5.86	98.57
17.838	0.79	0.811	0.812	0.804	17.89	100.33
35.676	1.539	1.572	1.63	1.580	35.57	99.71
m	0.0439					
p	0.0187					

Los datos empleados corresponden a la **Figura 14**. Los resultados obtenidos de los ensayos cumplen con el criterio de validación descrito por la AOAC.

3.1.7. Precisión

El grado de precisión se evaluó mediante la desviación estándar de los resultados. Estos datos fueron obtenidos por ensayos de repetibilidad y reproducibilidad:

Repetibilidad:

Se analizó en tres diferentes niveles de concentración por triplicado bajo las mismas condiciones en un intervalo de tiempo corto, por el mismo analista y en el mismo laboratorio. Los niveles de concentración se propusieron por la media de las

absorbancias de las muestras en análisis preliminares realizados para tener un aproximado del 100% de la concentración de tartrazina en muestras reales.

Tabla 10 Lecturas a 3 niveles de concentración evaluando repetibilidad

Concentración T	Absorbancia			Prom	Sr	Cv %
5.946	0.268	0.259	0.268	0.265	0.0052	1.96
17.838	0.817	0.813	0.809	0.813	0.0040	0.49
35.676	1.567	1.563	1.613	1.581	0.0278	1.76

El coeficiente de variación está dentro del criterio de aceptación para repetibilidad en el cual indica que el %CV debe ser < 3%, para los tres niveles de concentración dio 1,96%, 0,48% y 1,75% respectivamente para 5.94, 17.83 y 35.67 mg/L.

Reproducibilidad:

Se realizó tres análisis por triplicado del nivel aproximado al 100%, en tres días distintos por un mismo analista, en las mismas condiciones y laboratorio.

Tabla 11 Lecturas en 1 nivel de concentración, diferentes días evaluando reproducibilidad

Lectura	Fecha	Lectura
1	día 1	0.817
2	día 1	0.813
3	día 1	0.809
4	día 2	0.813
5	día 2	0.815
6	día 2	0.818
7	día 3	0.812
8	día 3	0.813
9	día 3	0.815
	Promedio	0.814
	Sr	0.0027
	CV%	0.33

La desviación estándar obtenida es de 0.0027 y su coeficiente de variación calculado indica 0.33%. La reproducibilidad cumple para el criterio de aceptación, CV%, 0,33% < 3%.

3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES EN BEBIDAS GASEOSAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

En el análisis de las muestras reales a cada una se le dio un rotulo único en este caso como se seleccionó 2 bebidas gaseosas de cada marca va a tener un rotulo "1x" y "2x" respectivamente para cada bebida muestreada.

La bebida gaseosa se desgasifico previamente en baño de ultrasonido por 15 minutos y luego se filtró con filtros PDVA grado HPLC debido a la presencia turbidez en tres muestras después de sonificar. Luego de esto se comprobó si parte de la concentración del analito de interés se perdía por el filtrado (**Tabla 20,21,22**).

Muestra "C":

Tabla 12 Lecturas pre y post- filtrado Muestra "C"

Sin filtrar			Promedio
0.131	0.132	0.13	0.131
0.13	0.132	0.13	0.131
0.13	0.132	0.13	0.131
Total, promedio			0.131
Filtrado			Promedio
0.126	0.128	0.13	0.128
0.126	0.127	0.131	0.128
0.126	0.128	0.131	0.128
Total, promedio			0.128
Promedio filtrado y no filtrado			0.130
Sr			0.001
CV%			1.115

Muestra "H":

Tabla 13 Lecturas pre y post- filtrado Muestra "H"

Sin filtrar			Promedio
0.486	0.488	0.486	0.487
0.485	0.487	0.487	0.486
0.485	0.487	0.486	0.486
Total, promedio			0.486
Filtrado			Promedio
0.49	0.491	0.491	0.491
0.49	0.491	0.49	0.490
0.49	0.491	0.49	0.490
Total, promedio			0.490
Promedio filtrado y no filtrado			0.488
Sr			0.002
CV%			0.421

Muestra "A"

Tabla 14 Lecturas pre y post- filtrado Muestra "A"

Sin filtrar			Promedio
0.049	0.049	0.049	0.049
0.048	0.049	0.048	0.048
0.049	0.049	0.049	0.049
Total, promedio			0.049
Filtrado			Promedio
0.047	0.048	0.047	0.047
0.046	0.048	0.047	0.047
0.046	0.048	0.048	0.047
Total, promedio			0.047
Promedio filtrado y no filtrado			0.048
Sr			0.000
CV%			0.810

Los coeficientes de variación se encontraron dentro del rango de aceptación < 3%, entonces la pérdida de muestra en el filtrado no es proporcional a una disminución de la concentración de tartrazina en las muestras.

Por cada muestra y su duplicado se realizó tres veces la lectura de cada una, se promedió y mediante la ecuación de la recta promediada obtenida en la **Figura 10** interpolando los datos con la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de cada muestra.

Tabla 15 Concentración de tartrazina en muestras reales por espectrofotometría

Replicas	Abb Mt.	Abb Mt	Abb Mt	Promedio	Concentración
1A	0.049	0.046	0.047	0.047	0.798
1B	0.57	0.573	0.576	0.573	12.664
1C	0.133	0.142	0.140	0.138	2.852
1D	0.75	0.757	0.758	0.755	16.772
1E	0.905	0.913	0.924	0.914	20.361
1F	0.336	0.338	0.337	0.337	7,336
1G	0.046	0.049	0.047	0.047	0.798
1H	0.487	0.496	0.497	0.493	10.865
2A	0.053	0.054	0.054	0.054	0.941
2B	0.581	0.582	0.582	0.582	12.859
2C	0.128	0.128	0.129	0.128	2.626
2D	0.757	0.757	0.757	0.757	16.817
2E	0.916	0.916	0.917	0.916	20.414
2F	0.33	0.330	0.330	0.330	7.178
2G	0.04	0.041	0.040	0.040	0.640
2H	0.489	0.489	0.489	0.489	10.767

Según los ensayos de Rodríguez y colaboradores en el cual se llevaron a cabo estudios de cuantificación de tartrazina en bebidas deportivas, demostraron que existía una concentración relativamente baja (3.84 mg/L), en el actual estudio refleja que en bebidas gaseosas la concentración máxima determinada mediante el método espectrofotométrico UV-VIS, es de 20.414 mg/L. Existiendo diversas causas para que existan variación en sus concentraciones, por mencionar algunas; envases, etiquetas, marketing y color asociado al sabor. Por lo que obliga a mantener concentraciones diferentes, asociados a las tonalidades de los alimentos que representan.

Los resultados de las concentraciones oscilan entre 0.6 mg/L hasta 20 mg/L de todas las muestras analizadas, de las mismas se trabajó con un placebo el cual presenta coloración similar, pero carece de concentración de tartrazina. El denominado placebo se lo rotulo como "F" y en las lecturas generó señal de absorbancia a 427 nm de 0.33

por lo tanto una concentración de 7.178 promedio. Por lo tanto, el método espectrofotométrico no discrimina otros colorantes de la tartrazina.

3.3. RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

Análisis Preliminares:

Se realizó una variedad de ensayos en los cuales se determinó la fase móvil final a usar, Flujo, tiempo de corrida cromatográfica, todos estos aplicados para una optimización del método.

Fase Móvil Inicial obtenida de Alves y colaboradores (2008):

- Metanol grado HPLC: 45%
- Acetato de amonio 0,08 mol/L: 55%
- Flujo 1 ml/min
- Tiempo de corrida cromatográfica de 20 min.

Como se observa en el **Anexo 6** este cromatograma generado no es conveniente; por lo tanto, se procederá a optimizar el método.

Se realizó una serie de combinaciones entre solventes, agua, buffer en conjunto con el flujo como se observa en el **Anexo 7**, **Anexo 8**, **Anexo 9**.

Para una fase más acuosa el pico del cromatograma no es simétrico o de tendencia Gaussiana, con solvente de acetonitrilo y metanol no se observa un pico medible o cuantificable y con mayor cantidad de Acn el pico sigue siendo asimétrico:

- **Anexo 7:** Metanol: 20% Agua: 35% Buffer Acetato de amonio.: 45%
- **Anexo 8:** Metanol: 25% Acetonitrilo: 25% Buffer Acetato de amonio: 50%
- **Anexo 9:** Acetonitrilo: 50% Agua: 15% Buffer Acetato de amonio: 35%

Al observar que el **Anexo 7** solo con un porcentaje pequeño de metanol el pico se observaba de forma simétrica se lo optimizo con más fase móvil acuosa, entonces se concluyó que la fase móvil ideal sería:

Anexo 10: Metanol 20% Agua: 25% Buffer Acetato de amonio.: 55%

Pero aun así el tiempo de retención era muy temprano observándose el pico al primer minuto lo cual no es recomendable, por lo tanto, el flujo se disminuyó de 1 mL/min a 0,4 mL/min.

3.3.1. Selectividad

En el análisis cromatográfico de la tartrazina se demostró que el método no presenta interferencias significativas, el tiempo de retención del estándar obtenido con las condiciones elegidas según el **Anexo 11** comparado con la matriz sin el analito presente a investigar indicado en el **Anexo 12**. En las corridas de las matrices fortificadas con tartrazina muestra un tiempo de retención muy similar en todos los niveles de concentración obtenidos.

Tabla 16 Selectividad del método cromatográfico

Tiempo de retención (min)			Media .	%CV	Tiempo de retención +/-
4.99	4.98	4.99	4.99	1.18	0.058

3.3.2. Linealidad

Para la determinación de la linealidad se prepararon cinco soluciones estándar a concentraciones de 6, 12, 24, 36, 48 mg/L, como se indica en el punto 3.3.4. Las soluciones estándar se inyectaron junto con las muestras, por ende, solo se tomará tres curvas de calibraciones al azar de los 6 análisis cromatográficos de muestras que se realizaron. De esta manera se pudo determinar mediante los estimadores de regresión lineal del grafico promediado junto con una prueba T- student si el método tuvo una respuesta proporcional a la cantidad de analito que se determinó. Para observar los cromatogramas de linealidad ir al **Anexo 13**.

Tabla 17 Datos de la regresión lineal de la tartrazina en cromatografía

Nivel de C.	Promedio 1	Promedio 2	Promedio 3	Promedio F.	S	CV%
5.946	16155129	16000576	16232807	16129504	118217.13	0.73292477
11.892	31643751	31144468	32215737	31667985.3	536045.52	1.69270482
17.838	46946234	46868958	47464099	47093097	323612.05	0.68717513
23.784	62832882	62932882	63491421	63085728.3	354880.13	0.56253631
35.676	94280709	93721845	95044814	94349122.7	664132.57	0.70390964

Las lecturas del área de pico en la **Tabla 17** fueron calculadas estadísticamente por medio del programa Microsoft Excel en el cual se determinó el factor de respuesta del método (Y/X), el promedio de los factores, la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV%). Estos datos son representativos de la curva promediada obtenida como se indica en la **Figura 15**:

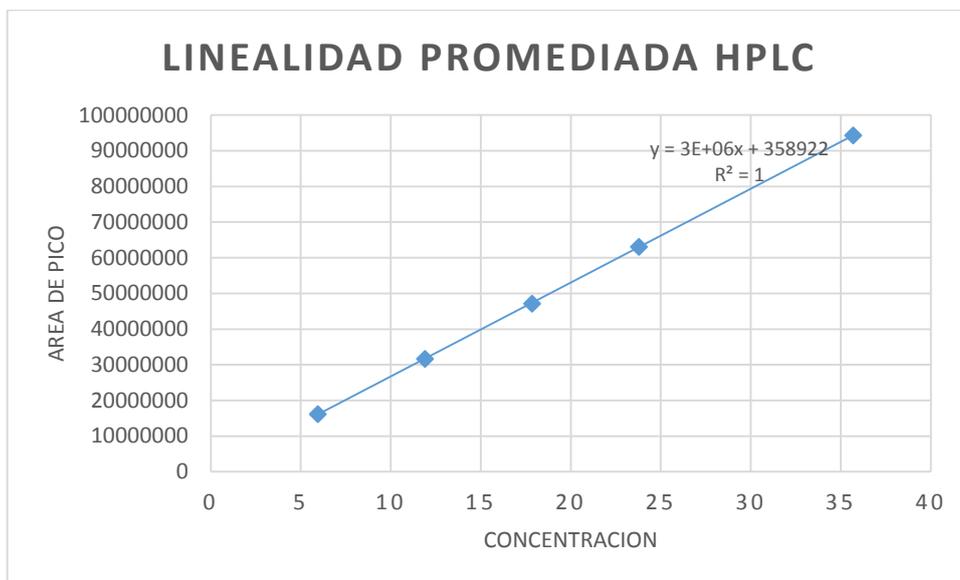


Figura 15 Linealidad global tartrazina en cromatografía

Tabla 18 Estadísticas de la regresión cromatografía

Coefficiente de correlación múltiple	1.0000
Coefficiente de determinación R²	1.0000
R² ajustado	1.0000
Error típico	164322.783
Observaciones	5

Como se observa en la **Tabla 18** los coeficientes de correlación y determinación son exactamente "1" por lo tanto se considera que existe una correlación positiva perfecta entre X/Y.

A continuación, se realizó un estudio de análisis de varianza para n-2 grados de libertad en un nivel de confianza del 95% y con un $\alpha=0.05$ la hipótesis a cumplir es $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$. Se formuló las siguientes hipótesis:

H_0 : No existe correlación entre X/Y

H₁: Existe correlación entre X/Y

Tabla 19 Análisis de Varianza linealidad cromatografía

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	1.0886E+16	4	2.7215E+15	1398 4.50	3.4780
Dentro de los grupos	1.9461E+12	10	1.9461E+11		
Total	1.0888E+16	14			

Al observarse el valor de 13984.49 > 3.4780 se establece que F_{calculado} es mayor al F_{crítico} por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se confirma que existe una gran correlación entre X/Y.

3.3.3. Sensibilidad del calibrado

De igual manera para una validación instrumental ya sea espectrofotométrica o cromatografía la sensibilidad se relaciona al valor de la pendiente (m) de la curva de calibración global.

$$S = \frac{\text{Respuesta del método}}{\text{Concentración de analito}} = \frac{\sum \text{Señal analítica}}{\sum \text{Concentraciones}} = 3E^6$$

Mientras más cercano estén los valores al eje de las "Y" habrá más variabilidad en los resultados de las lecturas; esto quiere decir que, si el método es más sensible, un cambio mínimo de concentración provocara mayor variación en los resultados. La respuesta instrumental se midió con la sensibilidad obtenida, es decir, se determinó el comportamiento del instrumento frente a una concentración de analito.

3.3.4. Límite de detección y cuantificación

Para el límite de detección y cuantificación se llevó a una dilución del estándar de tartrazina lo más cercano posible a la señal ruido provocada por la matriz, se tomará el

punto hasta que el pico sea detectable y a partir de ese se multiplicará por 10 para obtener el límite de cuantificación.

LOD: A partir de 10 ug/L

LOQ: A partir de los 100 ug/L

El valor obtenido es un estimado, el ensayo no es de relevancia siempre y cuando no sea trazas lo que se esté investigando.

3.3.5. Exactitud:

Veracidad o justeza

Se realizó el análisis acorde al punto 2.3.5 en tres niveles de concentración, se determinó el porcentaje de recuperación con respecto a los criterios de aceptación en base a la tabla de la AOAC para las concentraciones de 6,18 y 36 mg/L.

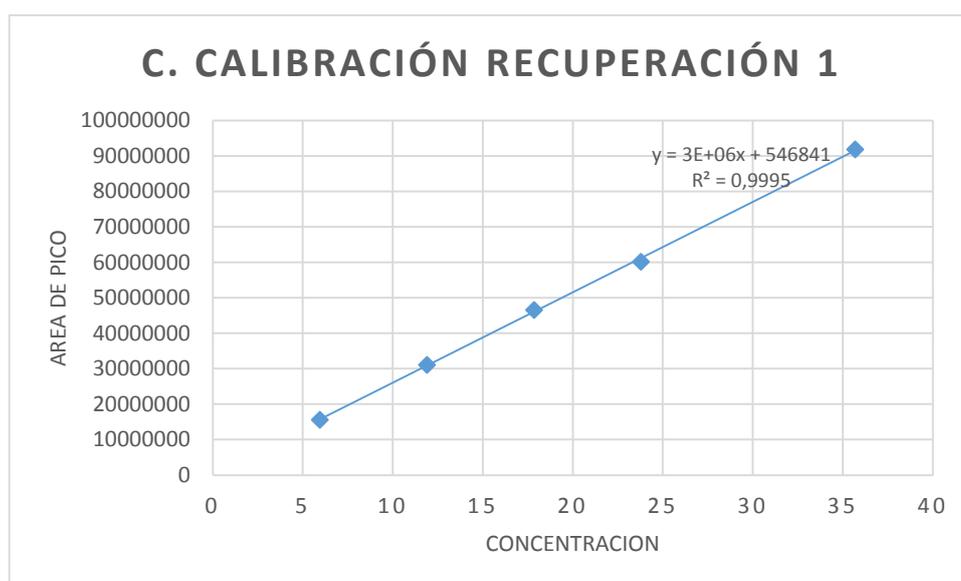


Figura 16 Curva porcentaje de recuperación 1

Tabla 20 Datos de la curva recuperación 1

Nivel de C.	Recuperación 1
5.946	15636123
11.892	31081015
17.838	46582667
23.784	60151295
35.676	91896167
Pendiente	2550170.93
Intercepto	546841.16

Tabla 21 Porcentaje de recuperación

Conc. Teórica	Recuperación 1		Promedio	Valor practico	% recuperación
5.946	16077338	15818061	15947699.5	6,039E+00	101,57
17.838	47589563	47602377	47595970	1,845E+01	103,43
35.676	93909785	92469735	93189760	3,633E+01	101,83

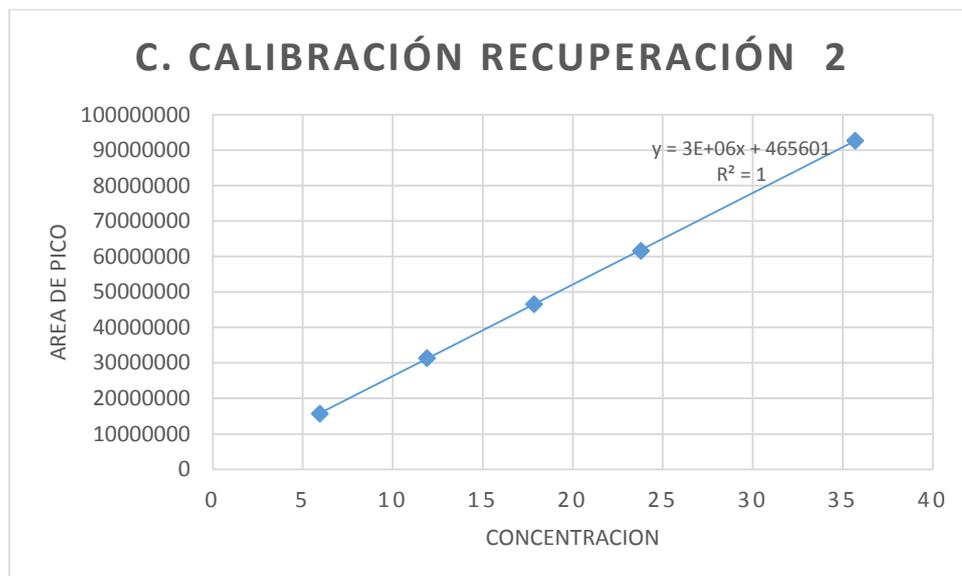


Figura 17 Curva porcentaje de recuperación 2

Tabla 22 Datos de la curva recuperación 2

Nivel de C.	Área 2
5.946	15752196
11.892	31382420
17.838	46582667
23.784	61622395
35.676	92729680
Pendiente	2580000
Intercepto	465601.03

Tabla 23 Porcentaje de recuperación 2

C. Teórica	Área 2		Promedio	Valor practico	% recuperación
5.946	16077338	15818061	15947699.5	5.134	101.59
17.838	47589563	47602377	47595970	15.68	103.49
35.676	93909785	92469735	93189760	30.88	101.86

En cada corrida de los tres niveles de concentración leídas por duplicado con su respectiva curva de calibración se logró determinar el porcentaje de recuperación el cual llevo entre 101% a 103%, por lo tanto, se considera un resultado aceptable para la validación del método de tartrazina según la tabla de la AOAC (**Anexo 2**).

3.3.6. Precisión

Se estableció la precisión por medio de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Se determinó la desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados.

Repetibilidad:

Se analizó en tres diferentes niveles de concentración por triplicado bajo las mismas condiciones en un intervalo de tiempo corto, por el mismo analista y en el mismo laboratorio.

Tabla 24 Repetibilidad

Con. T	Área de pico			Prom	Sr	Cv %
5.946	16155129	16000576	16232807	16129504	118217.13	0.73
17.838	46946234	46868958	47464099	47093097	323612.049	0.69
35.676	94280709	93721845	95044814	94349122.7	664132.567	0.70

El coeficiente de variación cumplió con el criterio de aceptación para repetibilidad en el cual se indica que el %CV debe ser <2%. En los tres niveles de concentración dio 0.73%, 0,69% y 0,70% respectivamente para 5.94, 17.83 y 35.67 mg/L.

Reproducibilidad:

Se realizó 2 análisis del nivel aproximado al 100% de las muestras en 2 días distintos por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo y laboratorio.

Tabla 25 Reproducibilidad

Lectura	Fecha	Lectura
1	día 1	46946234
2	día 1	46868958
3	día 1	47464099
4	día 2	48032882
5	día 2	47562348
6	día 2	48786609
Promedio		47610188.3
Sr		717847.34
CV%		1.51

El coeficiente de variación del promedio de los resultados fue 1.5% esto indica que el criterio de aceptación se cumple.

$$CV\% = 0.33\% < 2\%.$$

Con respecto a la validación, en una comparación de los dos métodos no hubo diferencias significativas en los coeficientes de correlación obtenidos de las curvas de

calibración, por lo tanto, se dice que ambos métodos responden de forma óptima. El límite de detección de HPLC es más sensible que el de espectrofotometría, es decir se puede detectar concentraciones menores. La recuperación del método espectrofotométrico fue casi perfecta a comparación del cromatográfico que oscilaba entre 101 a 103%, por último, la precisión en ambos métodos al tener una desviación estándar <2% y 3% respectivamente para HPLC y espectrofotometría se considera un criterio aceptado por estar dentro del rango.

3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES EN BEBIDAS GASEOSAS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN UV

El análisis de las muestras reales se realizó por tres días como se puede observar en los cromatogramas del **Anexo 14**, cada una con su respectiva curva de calibración por cada análisis, calculando la concentración final de cada muestra como se explica en la **Tabla 26** a continuación:

Tabla 26 Concentración de tartrazina en muestras reales

Rotulo	Conc. 1	Conc. 2	Conc.3	Promedio
1A	0.255	0.287	0.204	0.249
1B	12.927	12.992	12.846	12.922
1C	0.770	0.805	0.764	0.779
1D	16.936	17.035	16.980	16.984
1E	20.758	20.730	20.723	20.737
1F	0.010	0.056	0.020	0.029
1G	0.065	0.112	0.069	0.082
1H	10.870	10.942	10.886	10.899
2A	0.077	0.247	0.083	0.136
2B	13.019	13.165	12.955	13.046
2C	0.643	0.814	0.644	0.700
2D	16.757	16.909	16.720	16.795
2E	20.411	20.683	20.194	20.429
2F	-0.161	0.002	-0.164	-0.108
2G	-0.073	0.065	-0.115	-0.041
2H	10.690	10.854	10.600	10.715

Las concentraciones obtenidas de cada muestra fueron muy similares en cada cromatograma, exceptuando la muestra "F" la cual es un placebo, esta gaseosa no declaraba contener tartrazina, esta no presentó un pico cromatográfico en el tiempo de retención para tartrazina, por lo tanto, no presenta concentración alguna. La muestra "G" 'no sería de interés por contener una cantidad muy baja de tartrazina el cual está en el rango del límite de cuantificación y los resultados son inestables.

3.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Con el fin de saber si los dos métodos usados para determinar tartrazina en bebidas gaseosas existen diferencias significativas en los resultados obtenidos se realizó una prueba estadística de t-student para n-1 grados de libertad, 2 colas y un valor de $\alpha=0.05$ donde se planteó las siguientes hipótesis:

H_0 : Existen diferencias significativas en los resultados

H_1 : No existen diferencias significativas

Si $T_r > T_{\text{Crítico}}$ se rechaza la hipótesis nula por lo tanto no habrá diferencias significativas en las muestras analizadas por cada método.

Tabla 27 T-student análisis de muestras

	Variable 1	Variable 2
Media	9.043	7.77208181
Varianza	51.3097297	68.2266329
Observaciones	16	16
Coefficiente de correlación de Pearson	0.95898109	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	2.06561152	
P(T<=t) una cola	0.02829597	
Valor crítico de t (una cola)	1.75305036	
P(T<=t) dos colas	0.05659195	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13144955	

Mediante el análisis estadístico de los resultados de las muestras reales se acepta la hipótesis nula, $2.0656 < 2.1314$, lo cual indica que hay diferencias significativas entre los resultados planteado.

A pesar de esto como se puede observar tanto en los resultados de cromatografía y espectrofotometría, en concentraciones que no son muy bajas los resultados son muy fiables ya que como se muestra a continuación las concentraciones a partir de los 10 mg/L los resultados tienen un coeficiente de variación bajo en el resultado final $< 2\%$.

Tabla 28 Muestras finales cromatografía y espectrofotometría

Replicas	Espectrofotometría	HPLC	%CV
1A	0.798	0.249	74.2
1B	12.664	12.922	1.4
1C	2.852	0.779	80.7
1D	16.772	16.984	0.9
1E	20.361	20.737	1.3
1F	7.336	0.029	140.3
1G	0.798	0.082	115.1
1H	10.865	10.899	0.2
2A	0.941	0.136	105.8
2B	12.859	13.046	1.0
2C	2.626	0.700	81.9
2D	16.817	16.795	0.1
2E	20.414	20.429	0.1
2F	7.178	-0.108	145.7
2G	0.64	-0.041	160.7
2H	10.767	10.715	0.3

Las muestras A, C, G se obtuvo una variación de concentración entre los dos métodos, pero cabe recalcar que la muestra que las concentraciones son aparentemente muy bajas. Estas concentraciones no sobrepasan el límite de cuantificación en el caso de espectrofotometría, en HPLC al tener una sensibilidad mayor y un límite de cuantificación menor no genero ningún inconveniente en las muestras. La muestra 1F era un placebo en el cual no se declaraba tartrazina. Según la **Tabla 28** se puede apreciar la existencia de muestras que contienen concentraciones menores a los 10mg/L en espectrofotometría son poco fiables, comparado con cromatografía de alta eficacia existe una diferencia significativa y al presentar una mejor resolución del analito

y ser más sensible se puede llegar a cuantificar concentraciones bajas de forma confiable.

El límite máximo permisible (LMP) para alimentos según la FDA (2015) es de 200 mg/kg (partes por millón). En el análisis espectrofotométrico para determinar tartrazina se logró evidenciar que ningún valor sobrepasaba el LMP de hecho no se encuentra cercano al valor máximo permitido; lo cual genera la siguiente pregunta: ¿El Límite máximo permisible actual no genera ningún tipo de riesgo a la salud del ser humano?, tomando en cuenta que el uso es muy por debajo para bebida gaseosas en muestras reales y que existe mucha información con la asociación de diferentes trastornos. Lo cual genera la continuidad del estudio actual.

CONCLUSIONES

Se validó un método analítico espectrofotométrico para la determinación de tartrazina con detección UV-VIS en el cual se obtuvo una linealidad mayor a 0.99 tanto en el promediado como por cada curva individual realizada, la selectividad fue acorde al analito propuesto, se determinó el LOD y LQC en el cual se propuso que $LOD < LOQ < LMP$, la exactitud se demostró en porcentaje de recuperación fue entre 98% al 100% y por ultimo una precisión dada por repetibilidad y reproducibilidad se observó un %CV menor al 3%. Para todos los casos se cumple con los criterios de aceptación, entonces se declara que el método esta validado.

Se validó un método analítico cromatográfico para la determinación de tartrazina con detección UV en el cual se obtuvo una linealidad mayor a 0.99 tanto en el promediado como por cada curva individual realizada, la selectividad fue acorde al analito con respecto a su tiempo de retención que fue similar en todos los casos, el LOD y LOQ se calculó 3 veces y 10 veces más que el ruido base de la matriz, cumple el enunciado $LOD > LOQ < LMP$, la exactitud que se demostró en porcentaje de recuperación fue entre 101% al 103% lo cual según el criterio de la AOAC es válido para concentraciones bajas de 10 a 100 mg/L y por ultimo una precisión dada por repetibilidad y reproducibilidad se observó un %CV menor al 2%. Para todos los casos se cumple con los criterios de aceptación, entonces se declara que el método esta validado

La comparación de los resultados de las muestras reales con los 2 métodos previamente validados, demostró que existen diferencias significativas, pero dependiendo de la naturaleza y tipo de análisis a realizar se podría realizar los ensayos por cualquiera de los dos métodos, teniendo en cuenta que existen muestras que presentan turbidez por lo tanto se requiere un filtrado de la muestra previo el análisis para espectrofotometría de la misma forma que HPLC. En el método espectrofotométrico si la muestra llegase a ser muy coloreada es necesario realizar una dilución de esta para determinar tartrazina, el método espectrofotométrico no discrimina la señal de otros colorantes de la tartrazina como se vio en la muestra placebo que a pesar de no declarar tartrazina dio una señal analítica cuantificable, a diferencia de HPLC si se logró cuantificar correctamente este placebo dando como resultado ausencia de este aditivo en la muestra, por lo tanto si se tiene una muestra en la cual se desconoce si está presente o no este aditivo es mejor realizarla por HPLC pero si es declarado en el etiquetado, por costo y tiempo se preferirá

espectrofotometría. En término de concentración a partir de los 10 mg/L el uso de ambos métodos es aceptable, para concentraciones más bajas es recomendable el uso de cromatografía debido a que este método será más sensible para la determinación de tartrazina.

En conclusión, cual sea el interés del analista en utilizar cualquiera de estas dos técnicas podrá realizarlas de manera reproducible, siempre y cuando tomando en cuenta los aspectos importantes que se han mencionado.

RECOMENDACIONES

El presente tema de tesis se desarrolló a partir del planteamiento de Proyecto Semillero de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, lo cual tiene por objeto generar continuidad de investigación y en el desarrollo de la misma ya que se presentó resultados que serán de gran interés científico ya que los límites máximos permisibles y la ingesta diaria admisible podrían ser objeto de una regulación más estricta por parte de organismos ecuatorianos como el ARCSA y así relacionar con la toxicología de no solo este aditivo alimentario, si no todos los azo-colorantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Alayo Nolasco, M. K., & Montoya Barrientos, E. (2013). *Identificación cualitativa de colorantes artificiales en raspadillas y cremoladas expendidas en el centro cívico de la ciudad de trujillo, marzo - abril 2013*. Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica. Recuperado a partir de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1651>
- Alvarez, A. 1, Matdonado, L., Gaggiotti, M., Caporgno, J., & Bedascarrasbure, E. (2006). Comparación de los métodos de HPLC y Espectrofotometría molecular visible- uv en la determinación de HME en miel. *INTA RAFAELA-ANUARIO 2006*. Recuperado a partir de <http://rafaela.inta.gov.ar/info/documentos/anuarios/anuario2006/apicultura-01.pdf>
- Alves, S. P., Brum, D. M., Branco de Andrade, É. C., & Pereira Netto, A. D. (2008). Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. *Food Chemistry*, *107*(1), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.054>
- Amin, K. A., Abdel Hameid, H., & Abd Elsttar, A. H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2994-2999. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.07.039>
- AOAC International. (2016). *Official methods of analysis*.
- Argueta Hernández, K. A. (2014). *Identificación y Cuantificación de los Colorantes Artificiales: Amarillo ocaso FCF (15,985), Rojo allura FD& C rojo No. 40 (16,035) y Tartrazina FD& C amarillo No.5 (19,140) en Alimentos Tipo Snack's a Base de Cereal de Maíz con Queso, Obtenidos a Partir*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado a partir de http://www.repositorio.usac.edu.gt/2072/1/06_3668.pdf
- Bateman, B., Warner, J. O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, C., ... Warner, J. (2004). The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Arch Dis Child*, *89*, 506-511. <https://doi.org/10.1136/adc.2003.031435>
- Bejarano Roncancio, J. J., & Suárez Latorre, L. M. (2015). Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de los alimentos de venta en espacios públicos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, *47*(3), 349-360. <https://doi.org/10.18273/revsal.v47n3-2015011>
- Bhatt, D., Vyas, K., Singh, S., John, P. J., & Soni, I. (2018). Tartrazine induced neurobiochemical alterations in rat brain sub-regions. *Food and Chemical Toxicology*, *113*, 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.011>
- Campos Honorato, T., Batista, E., do Nascimento, K. de O., & Pires, T. (2013). Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, *8*(1981-8203), 1-11. Recuperado a partir de <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1950>
- Diario Oficial De La Unión Europea. Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios, Diario Oficial de la Unión Europea § (2008).

- Doguc, D. K., Ceyhan, B. M., Ozturk, M., & Gultekin, F. (2013). Effects of maternally exposed colouring food additives on cognitive performance in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(7), 616-623. <https://doi.org/10.1177/0748233712436638>
- EFSA. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation Tartrazine (E 102). *EFSA Journal*, 7(11), 1331. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1331>
- Ensuncho, A. E., López, J. M., & Robles, J. (2012). Reactividad química de los azo colorantes amarillo anaranjado y rojo allura mediante descriptores globales y la función de fukui. *Informacion Tecnologica*, 23(6), 3-12. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000600002>
- FDA. (2015). Color Additive Inventories - Color Additive Status List. *Center for Food Safety and Applied Nutrition*. Recuperado a partir de <https://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm106626.htm>
- Gianotti, V., Angioi, S., Gosetti, F., Marengo, E., & Gennaro, M. C. (2005). Chemometrically Assisted Development of IP-RP-HPLC and Spectrophotometric Methods for the Identification and Determination of Synthetic Dyes in Commercial Soft Drinks. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(6), 923-937. <https://doi.org/10.1081/JLC-200051484>
- IARC. (2012). A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 100F*, 225-248.
- Ibañez, F., Torre, P., & Irigoyen, A. (1963). Aditivos alimentarios. *Universitas Navarrensis*, 1-10. <https://doi.org/10.1002/9780470996003.ch15>
- ICH. (2005). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *International Conference on Harmonization, 1994*(November 1996), 17. https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- INEC. (2014). Encuesta Nacional De Salud y Nutrición 2011 - 2013. *Ensanut 2011-2013*, 47. Recuperado a partir de www.ecuadorencifras.gob.ec/...inec/Estadisticas
- INEN-CODEX 192. (2016). NTE INEN-CODEX 192 NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS (CODEX STAN 192-1995, IDT) 455 Páginas. Recuperado a partir de <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/en/>
- INEN 1101. (2016). NTE INEN 1101 BEBIDAS GASEOSAS. REQUISITOS. TERCERA REVISION, 1-2.
- INEN 1101. (2017). NTE INEN 1101 BEBIDAS GASEOSAS. REQUISITOS. CUARTA REVISION.
- INEN 2739-1. (2014). NTE INEN 2739 ROTULADO DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA CONSUMO HUMANO. PARTE 1. REQUISITOS.
- ISO 17025. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. *Organización Internacional de Normalización, 2005*.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., ... Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children

- in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560-1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)
- Nettis, E., Colanardi, M. C., Ferrannini, A., & Tursi, A. (2003). Suspected tartrazine-induced acute urticaria/angioedema is only rarely reproducible by oral rechallenge. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(12), 1725-1729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2003.01825.x>
- Ortega Grisel, M., & Guerra, M. (2006). Separacion, caracterizacion estructural y cuantificacion de antocianinas mediante métodos químicos-físicos. Parte II. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Cana de Azúcar.*, XL(3), 3-11. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120665001.pdf>
- Planellas Tomas, F. (1998). *Determinacion de Bencidina y otras Aminas Aromáticas de Interés Toxicológico en Cueros Teñidos con Azocolorantes*. Universidad de Alicante. Recuperado a partir de <https://rua.ua.es/dspace/handle/10045/3840>
- Prado-Lobato, S. C., Hernández-Castillo, M., Moreno-Miranda, R., & Preciado-Márquez, F. (2012). Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina. *Pediatría de México*, 14(4), 172-175. Recuperado a partir de <http://www.medigraphic.com/pdfs/conapeme/pm-2012/pm124d.pdf>
- Rodríguez, M. C., Schenone, A. V., Sobrero, M. S., & Marsili, N. R. (2014). Cuantificación simultánea de colorantes en bebidas deportivas utilizando espectroscopia visible y PLS-1. *FABICIB*, 17(0), 74-84. <https://doi.org/10.14409/fabicib.v17i0.4310>
- Rubinson Kenneth A, R. F. J. (2001). *Análisis instrumental* (Primera Ed). Madrid: Pearson Educación S.A.
- SAE. (2018). ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN SEGÚN NTE INEN-ISO/IEC 17025:2006., 17. Recuperado a partir de www.acreditacion.gob.ec
- Sánchez Juan, R. (2013). La Química del Color en los Alimentos. *Química Viva*, 12(3), 234-246. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/863/86329278005.pdf>
- Sandoval, S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*, 66. Recuperado a partir de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf
- Schauss, A. G. (1984). Nutrition and Behavior: Complex Interdisciplinary Research. *Nutrition and Health*, 3(1-2), 9-37. <https://doi.org/10.1177/026010608400300202>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., Cervantes González, S., & Anzures, M. B. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6ta Edicio). Cengage Learning.
- Tanaka, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(2), 179-187. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2005.06.011>
- Zumbado Fernández, H. (2004). *Análisis Químico de los Alimentos. Métodos Clásicos* (Primera Ed). Cuba-La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos-Universidad de la Habana.

ANEXOS

Anexo 1 Certificado uso de laboratorio privado



CALEB BRETT ECUADOR S.A CERTIFICA

Al Sr. Joshia Alexander Macías Núñez con cedula de ciudadanía #0930890181, se permite el uso de nuestro Laboratorio acreditado bajo la norma *ISO/IEC 17025:2005*, para la realización de tu trabajo de titulación, cumpliendo de forma responsable las actividades propuestas y así mismo cuidando el laboratorio y su entorno.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Neidys", is positioned above the printed name.

Neidys Sánchez Hernández
Jefa de Laboratorio Físico Químico

intertek
Total Quality. Assured.
CALEB BRETT ECUADOR S.A.
RUC: 179928788001
Qca. Neidys Sánchez H.
Jefa de Laboratorio Físico-Química

Av. Joaquín Orrantía Gonzales y Juan Tanca Marengo, Centro Comercial Mall del Sol, Torre B, Oficina 505.
Guayaquil - Ecuador
Teléfono: +593.4.5017777
www.intertek.com.ec



Anexo 2 Recuperación en función a la concentración del analito

Fuente: (AOAC International, 2016)

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	Mean recovery, %
100	1	100%	98–102
10	10 ⁻¹	10%	
1	10 ⁻²	1%	97–103
0.1	10 ⁻³	0.1%	95–105
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90–107
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80–110
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	60–115
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40–120

Anexo 3 Tabla de Distribución t.student

2 colas		80%	90%	95%	98%	99%
v	$\alpha/2$	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015

1 cola		90%	95%	97.5%	99%	99,5%
v	α	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
	1		3.078	6.314	12.706	31.821
2		1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3		1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4		1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5		1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6		1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7		1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8		1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9		1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10		1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11		1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12		1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13		1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14		1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15		1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16		1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17		1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18		1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19		1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20		1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21		1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22		1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23		1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24		1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25		1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26		1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27		1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28		1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29		1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30		1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40		1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60		1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120		1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞		1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Anexo 4 Datos linealidad Tartrazina

Linealidad 1

Concentración mg/L	Absorbancia			Prom
5,946	0,268	0,268	0,268	0,268
11,892	0,537	0,537	0,537	0,537
17,838	0,817	0,817	0,818	0,817
23,784	1,082	1,082	1,081	1,082
35,676	1,564	1,564	1,567	1,565

Linealidad 2

Concentración mg/L	Absorbancia			Prom
5,946	0,26	0,259	0,259	0,259
11,892	0,536	0,536	0,535	0,536
17,838	0,813	0,813	0,812	0,813
23,784	1,073	1,072	1,073	1,073
35,676	1,562	1,563	1,563	1,563

Linealidad 2

Concentración mg/L	Absorbancia			Prom
5,946	0,268	0,268	0,268	0,268
11,892	0,54	0,541	0,54	0,540
17,838	0,81	0,809	0,809	0,809
23,784	1,079	1,081	1,078	1,079
35,676	1,613	1,614	1,613	1,613

Anexo 5 Linealidad Efecto Matriz

Linealidad fortificada 1

Concentración mg/L	Absorbancia			Prom
5,946	0,27	0,27	0,27	0,270
11,892	0,531	0,531	0,531	0,531
17,838	0,79	0,79	0,79	0,790
23,784	1,054	1,054	1,055	1,054
35,676	1,539	1,539	1,539	1,539

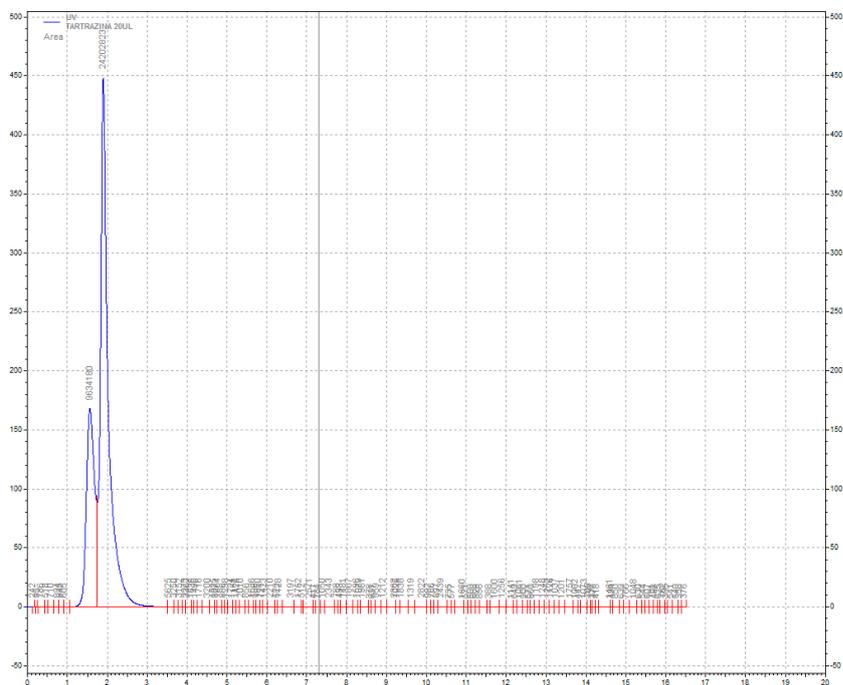
Linealidad fortificada 2

Concentración mg/L	Absorbancia			Prom
5,946	0,272	0,273	0,277	0,274
11,892	0,541	0,54	0,54	0,540
17,838	0,81	0,811	0,812	0,811
23,784	1,067	1,067	1,073	1,069
35,676	1,563	1,565	1,587	1,572

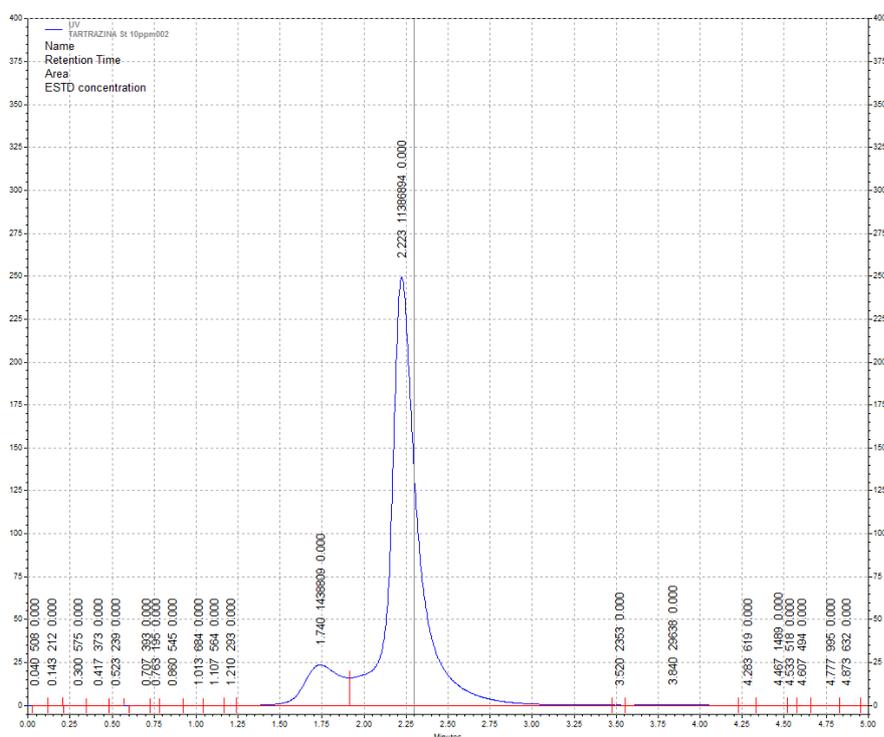
Linealidad fortificada 3

Concentración mg/L	Absorbancia			Prom
5,946	0,284	0,284	0,284	0,284
11,892	0,55	0,548	0,552	0,550
17,838	0,812	0,812	0,812	0,812
23,784	1,097	1,096	1,098	1,097
35,676	1,629	1,631	1,63	1,630

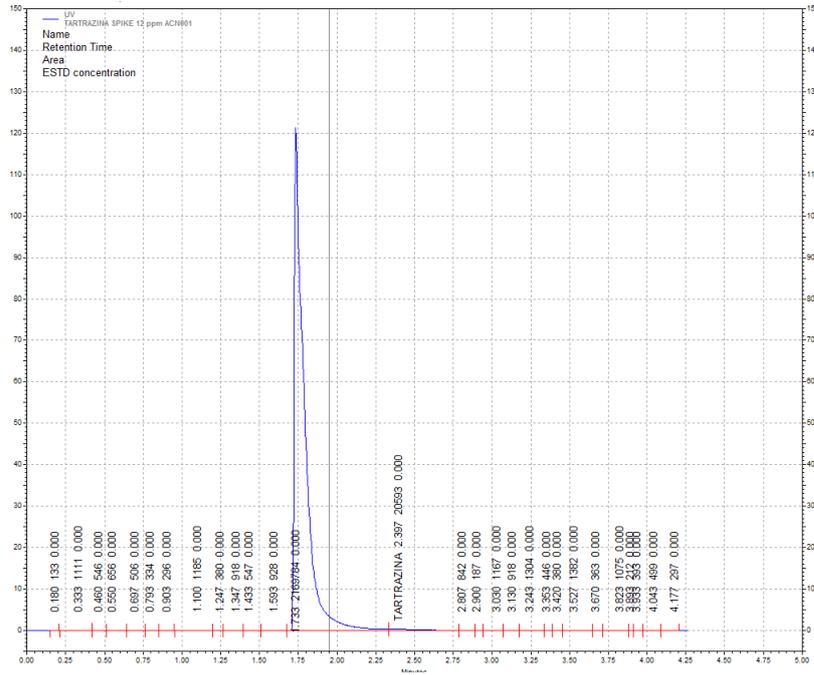
Anexo 6 Cromatograma con las condiciones obtenidas bibliográficamente por (Alves et al., 2008)



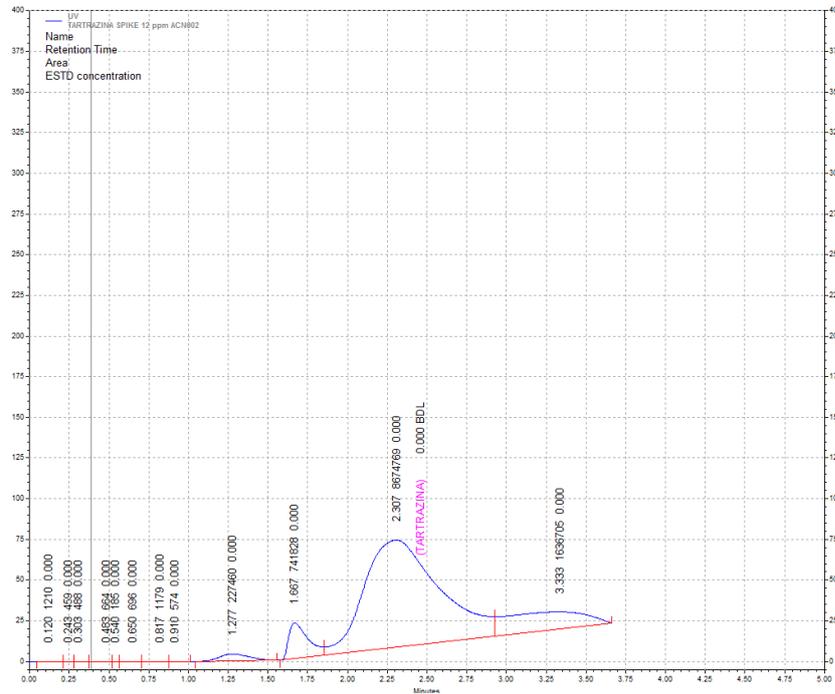
Anexo 7 Cromatograma Fase móvil metanol Agua Buffer a.a., 20:35:45



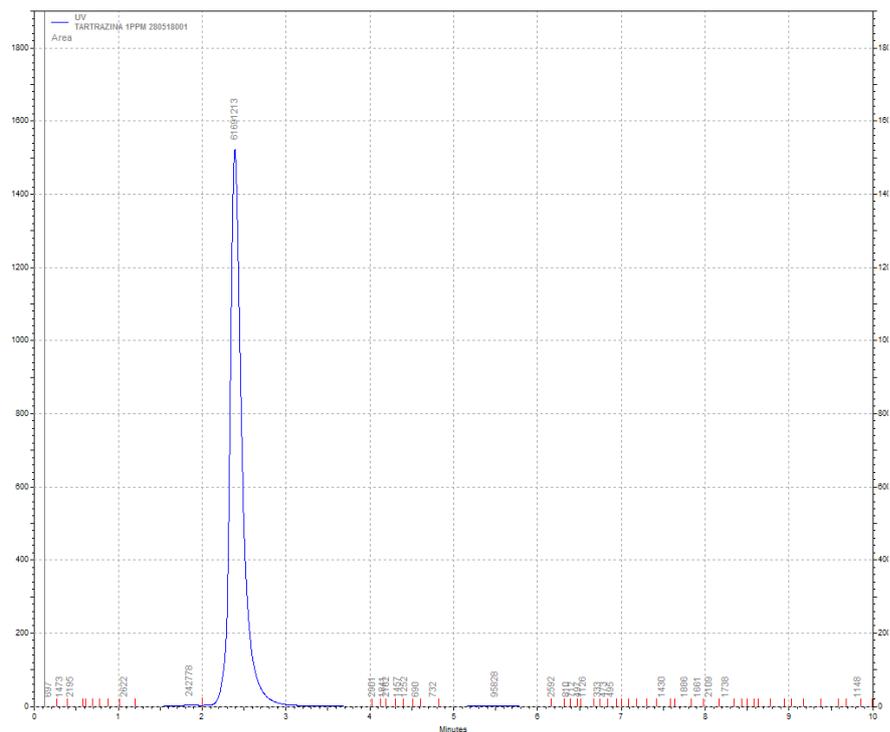
Anexo 8 Cromatograma metanol Acetonitrilo Buffer a.a., 25:25:50



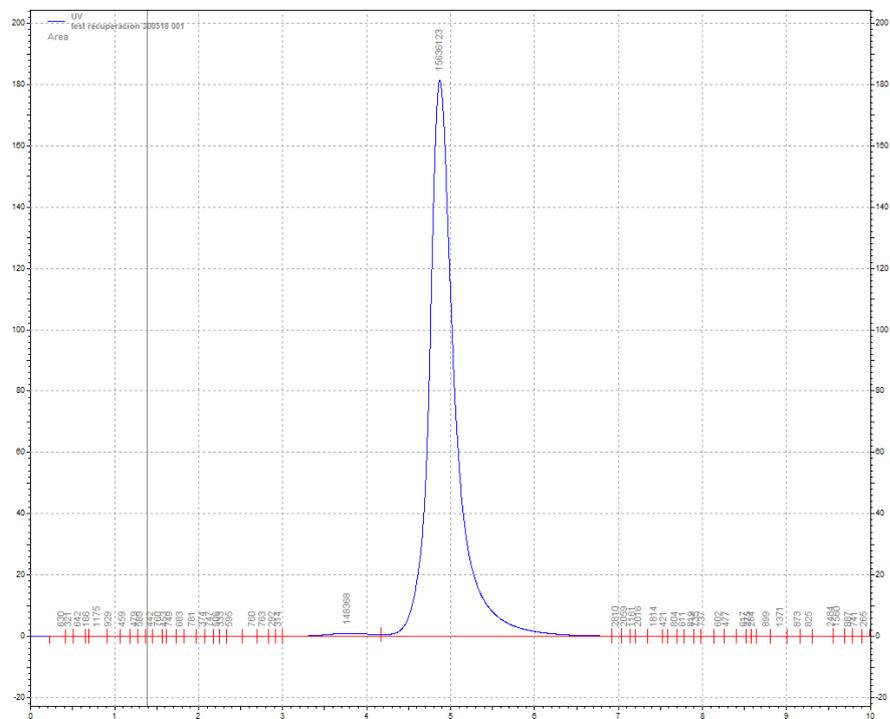
Anexo 9 Cromatograma Acn Agua Buffer a.a., 50:15:35

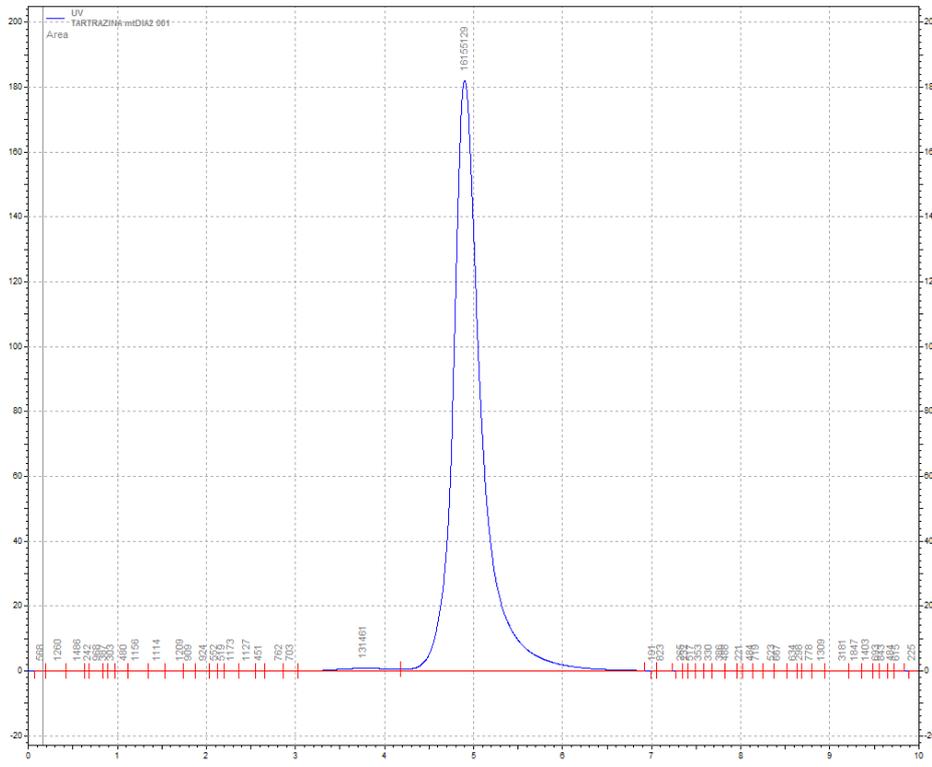
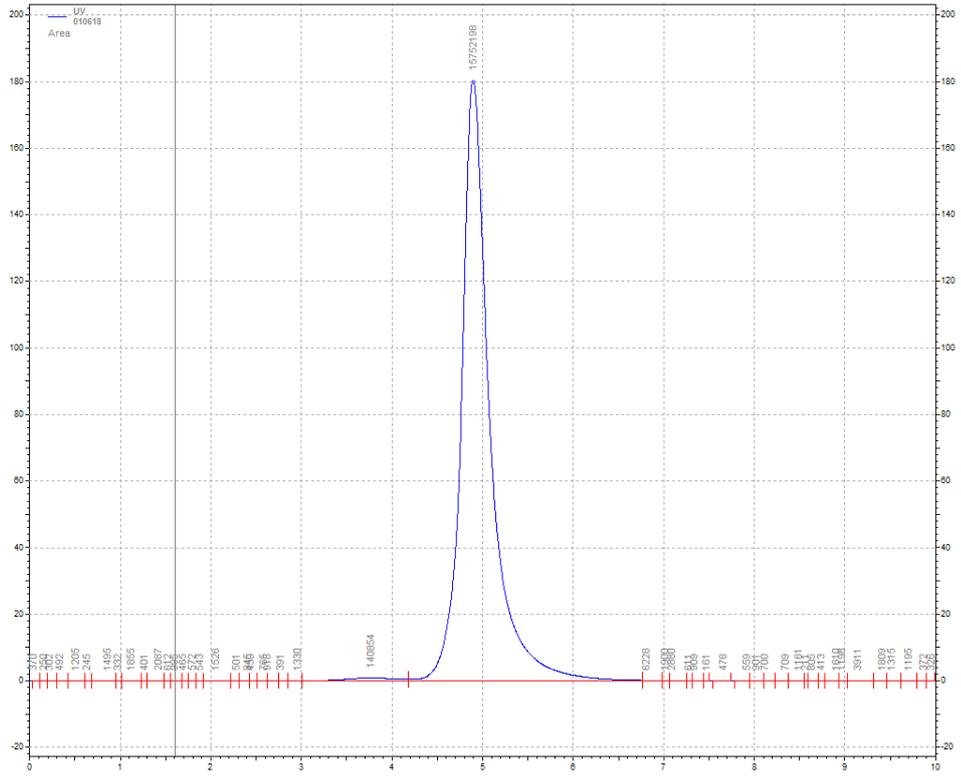


Anexo 10 Cromatograma Metanol Agua Buffer a.a., 20:25:55

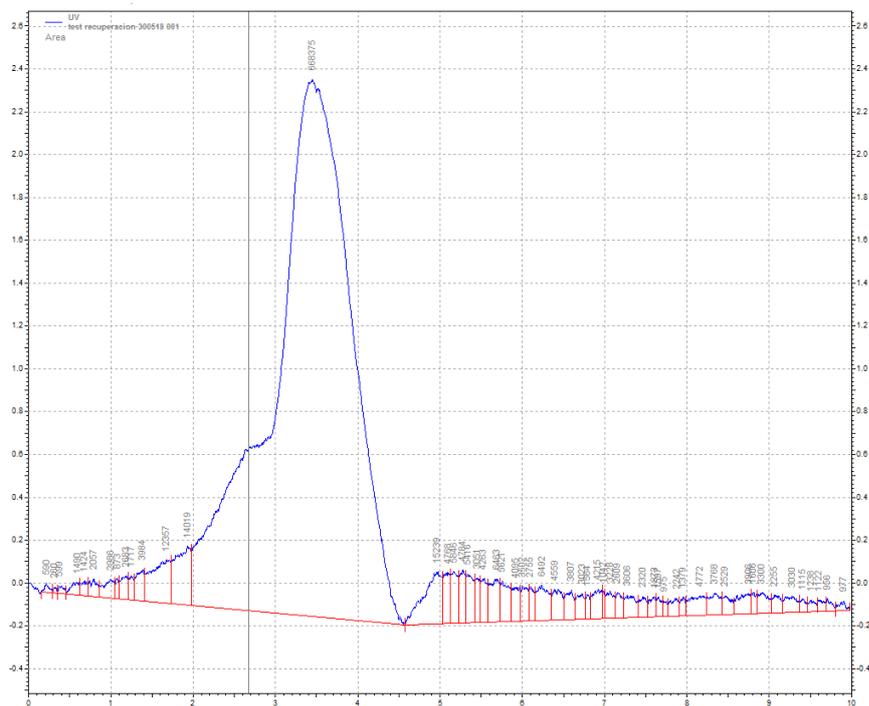


Anexo 11 Evaluación de la selectividad (tiempos de retención)

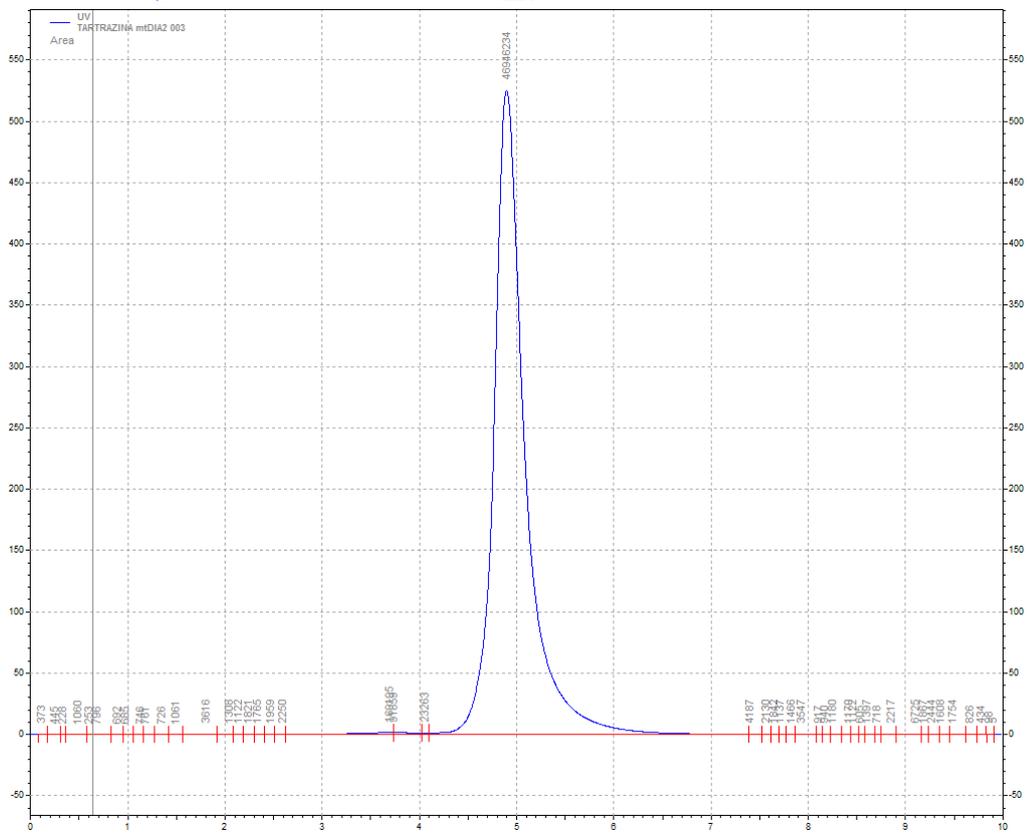
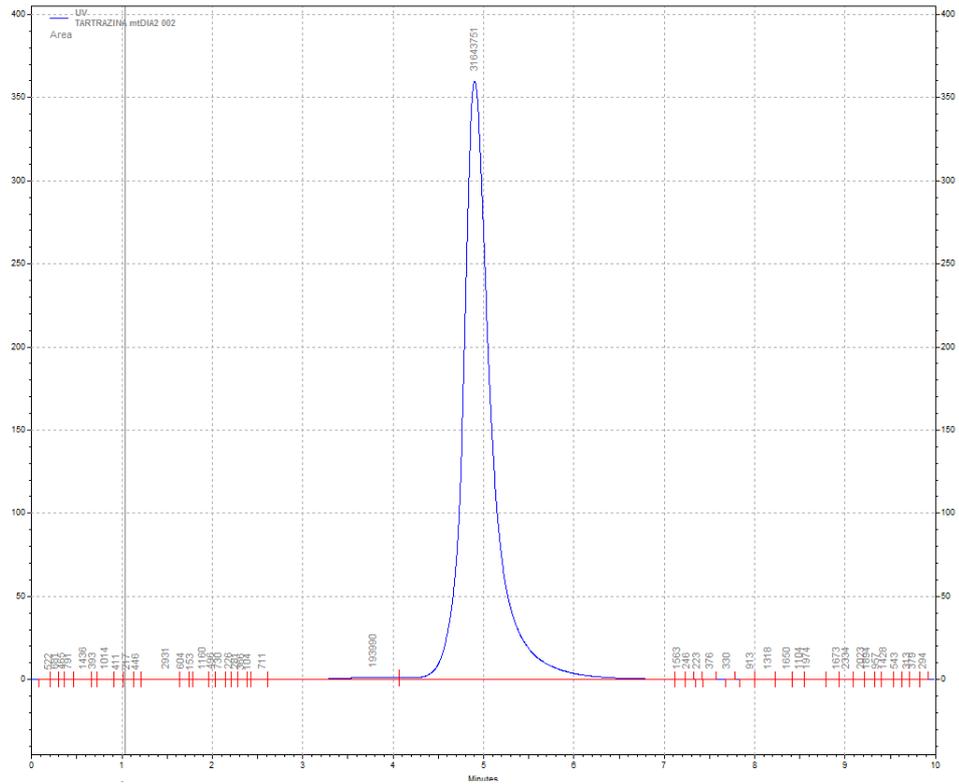


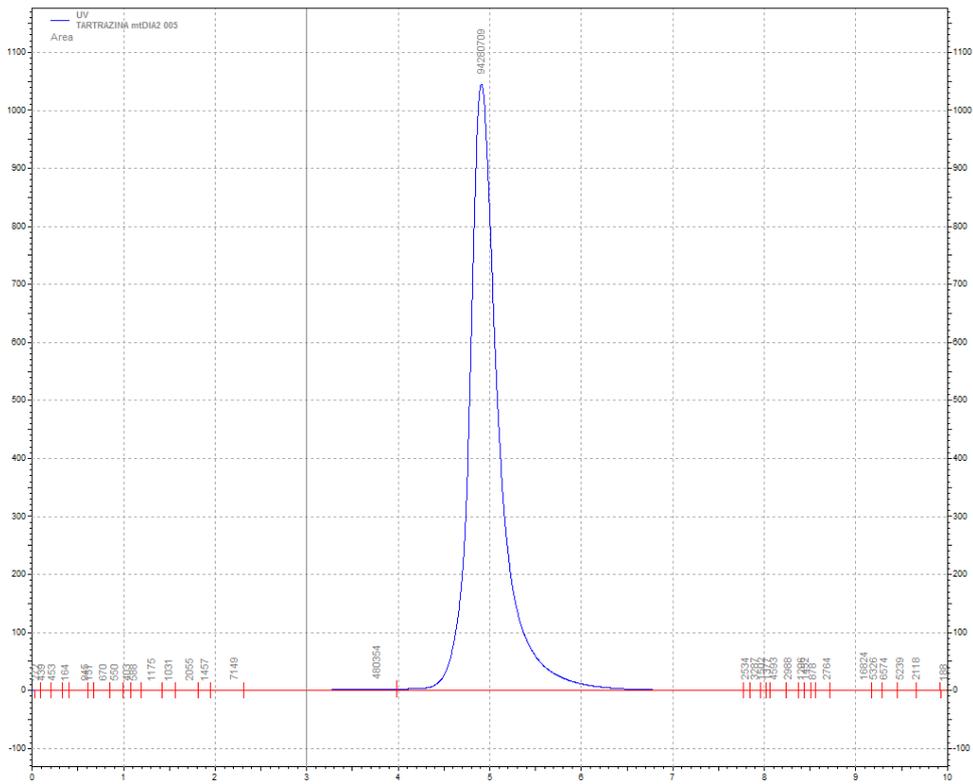
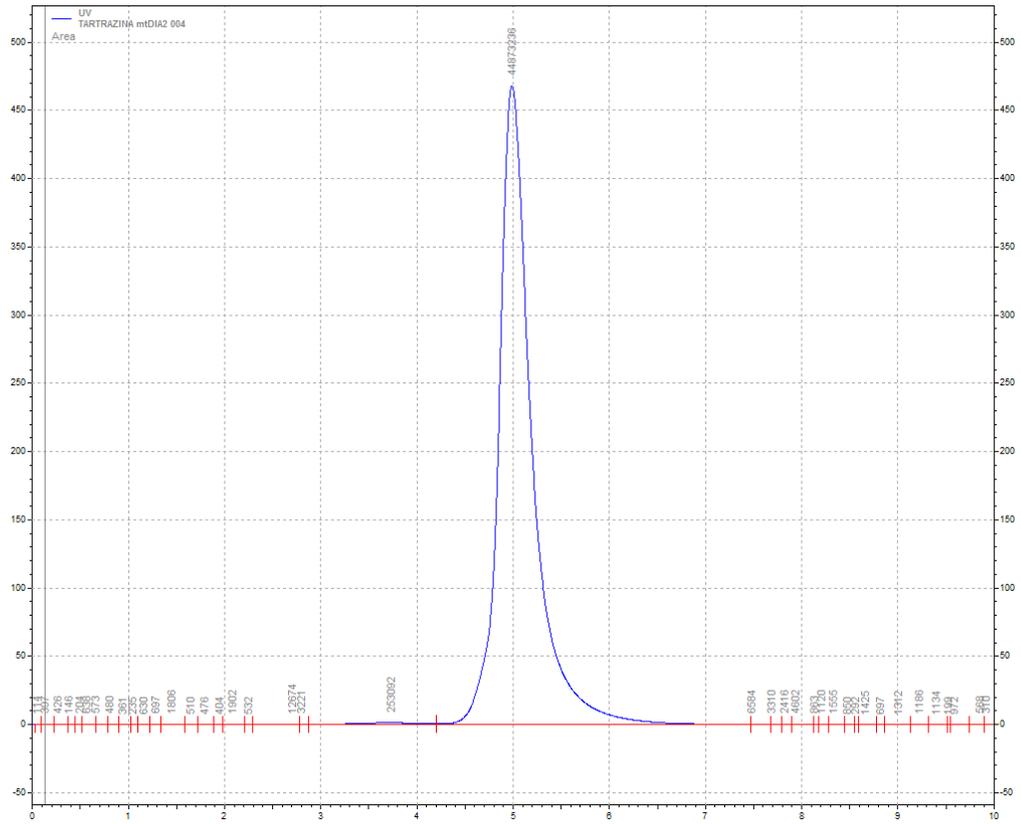


Anexo 12 Cromatogramas de blancos de matriz

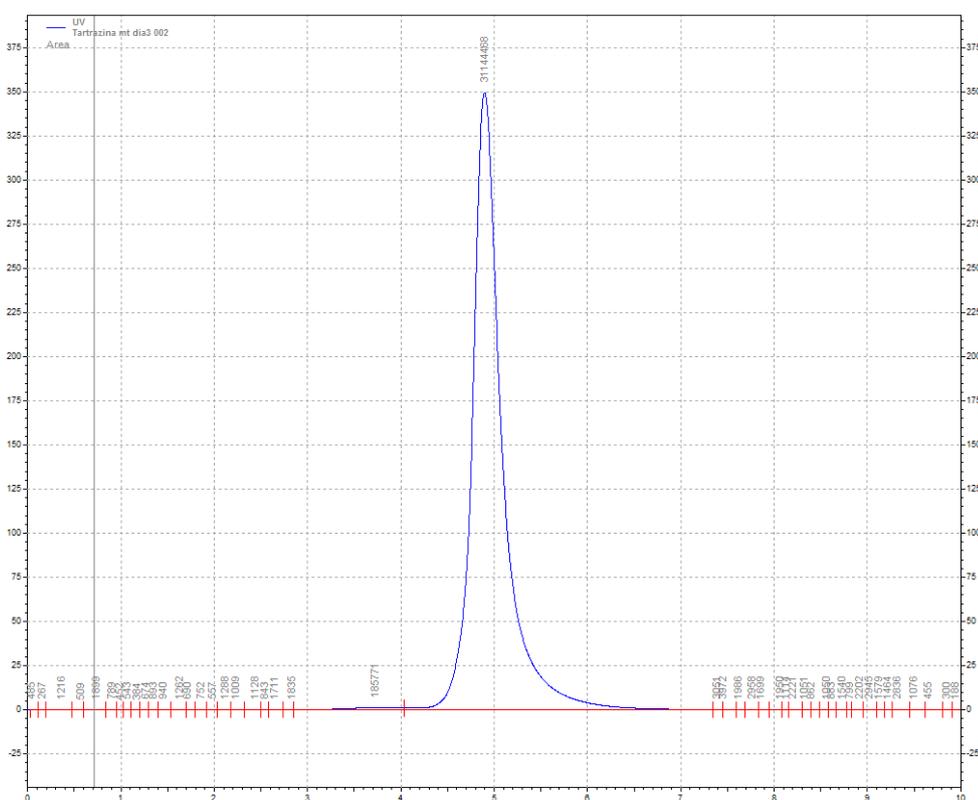
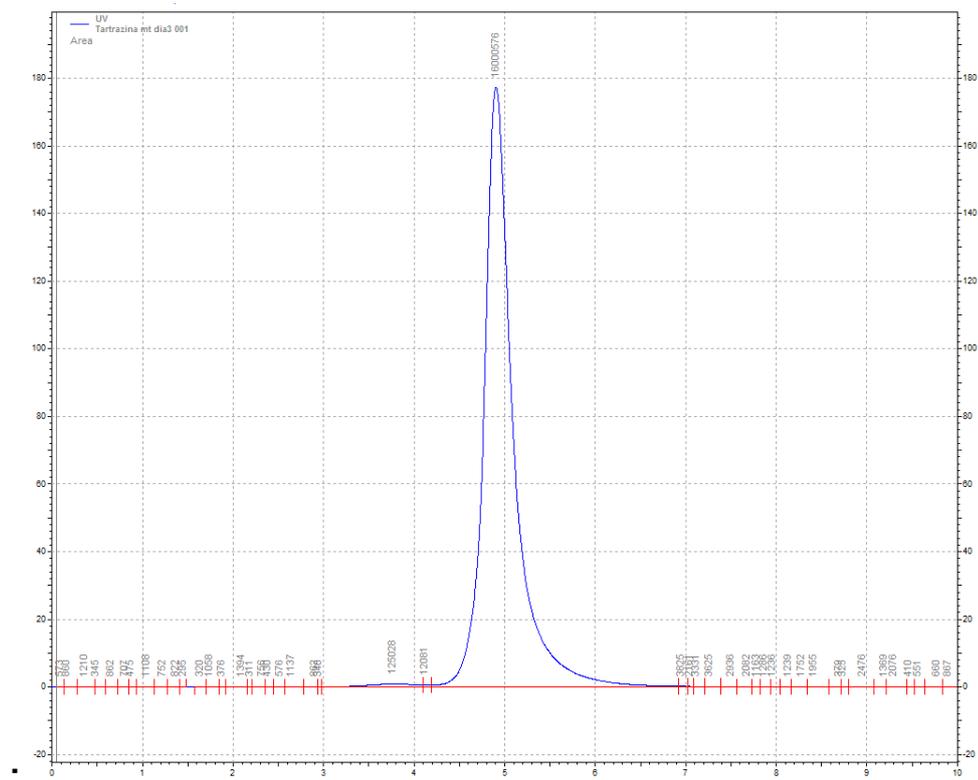


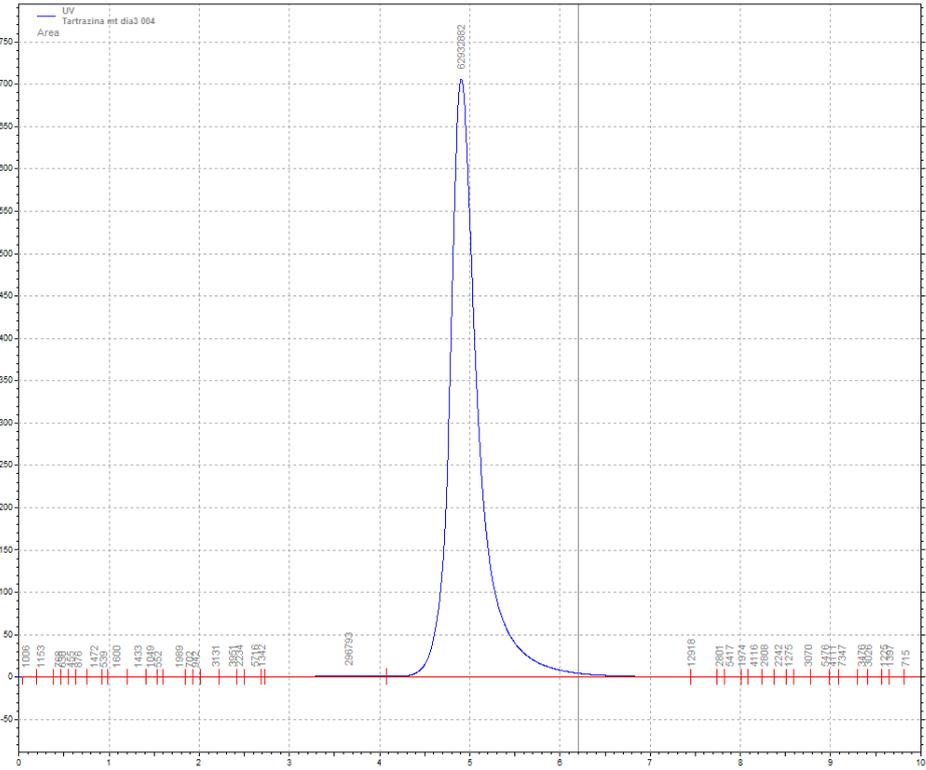
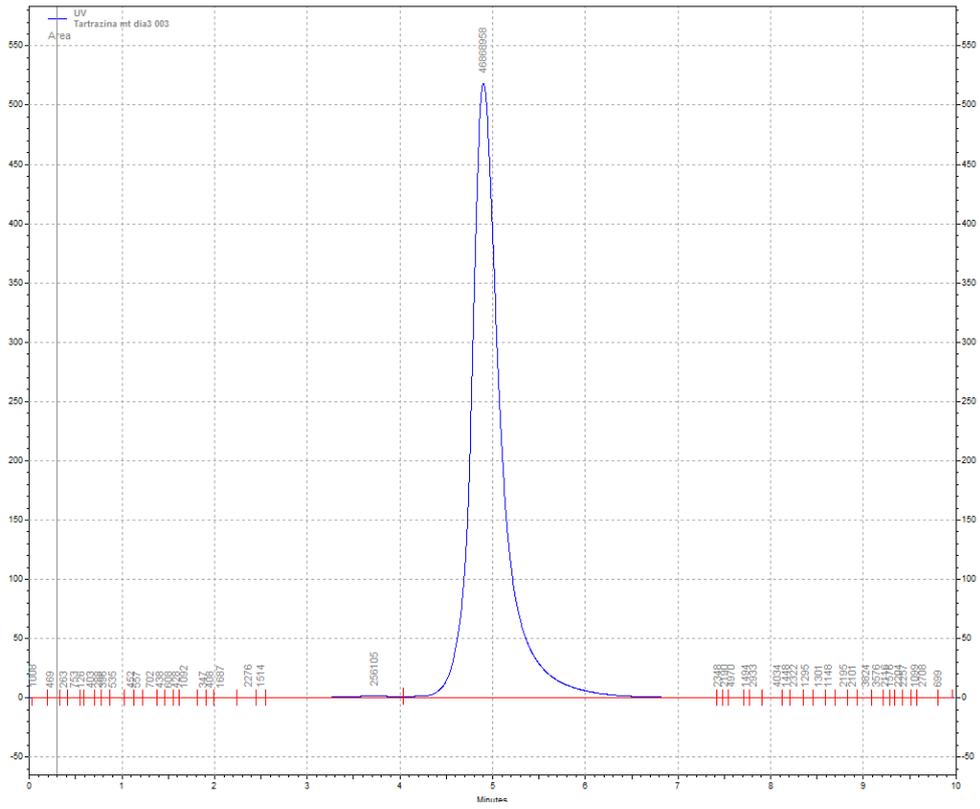
Anexo 13 Linealidad de la tartrazina

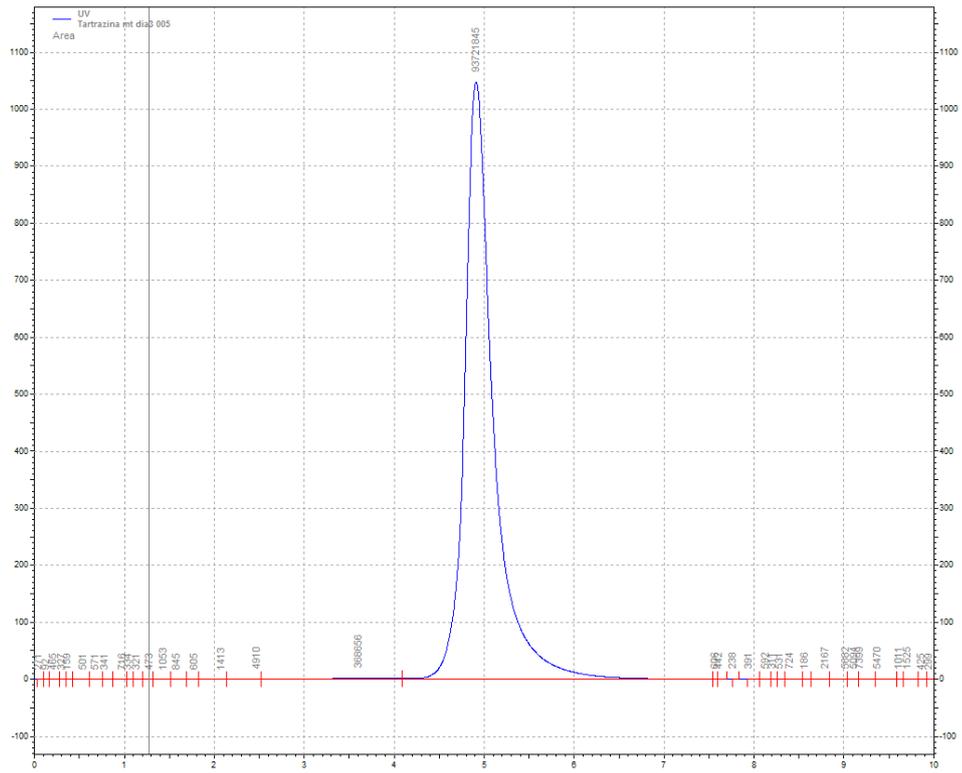




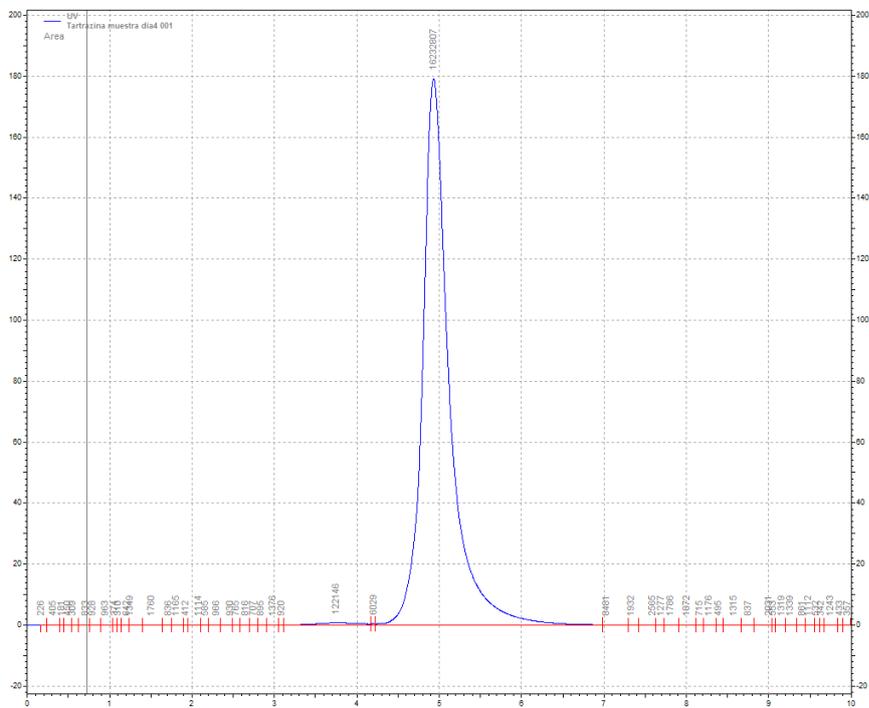
Segunda Curva:

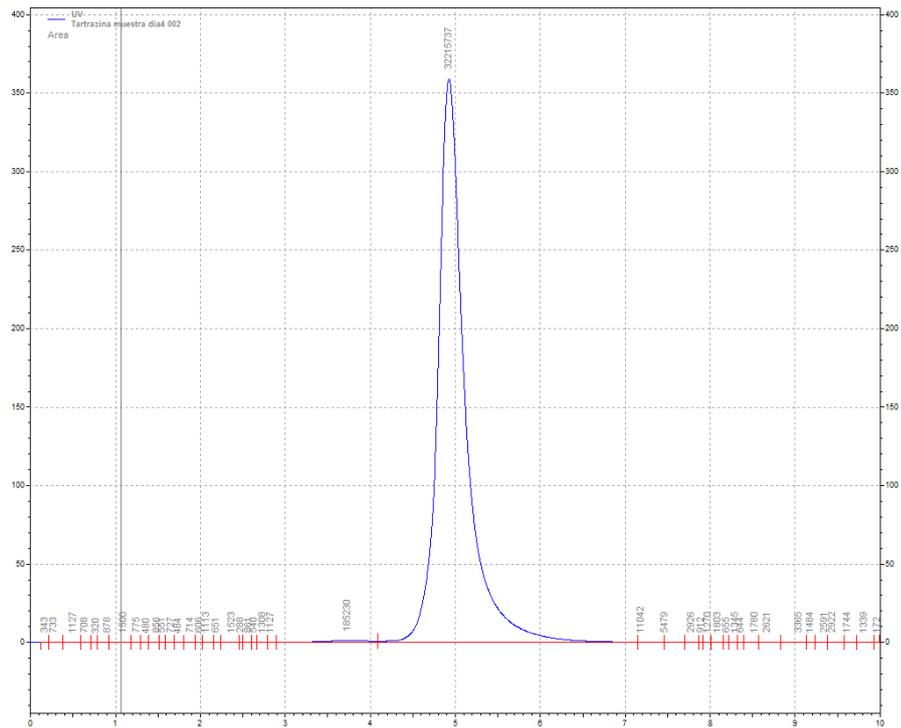


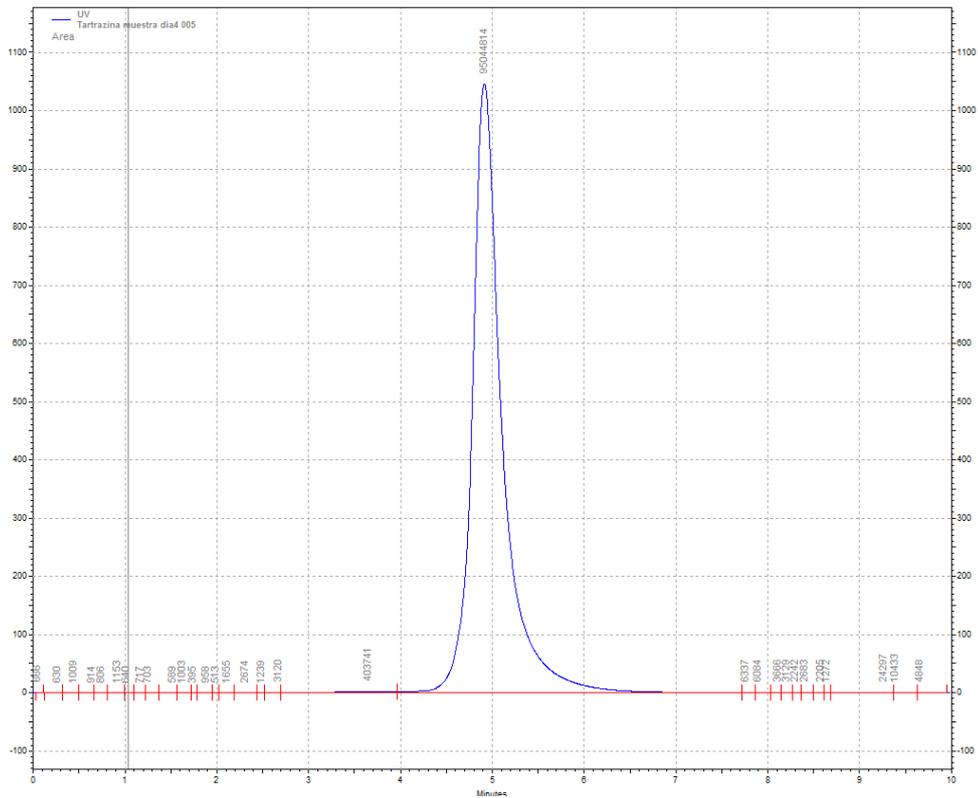
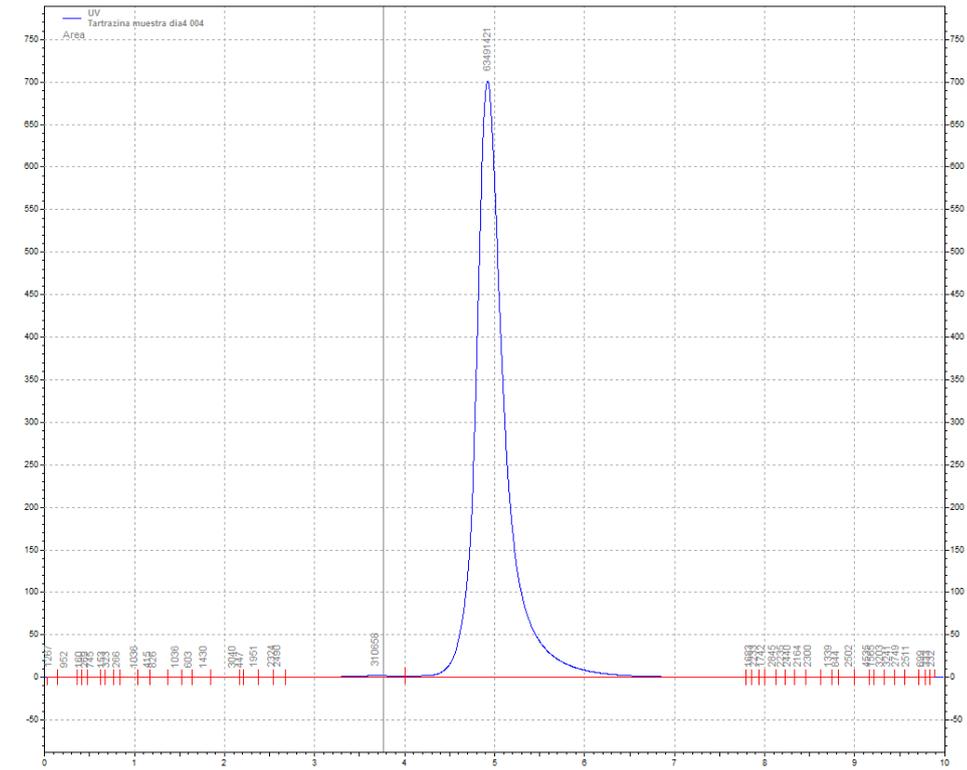




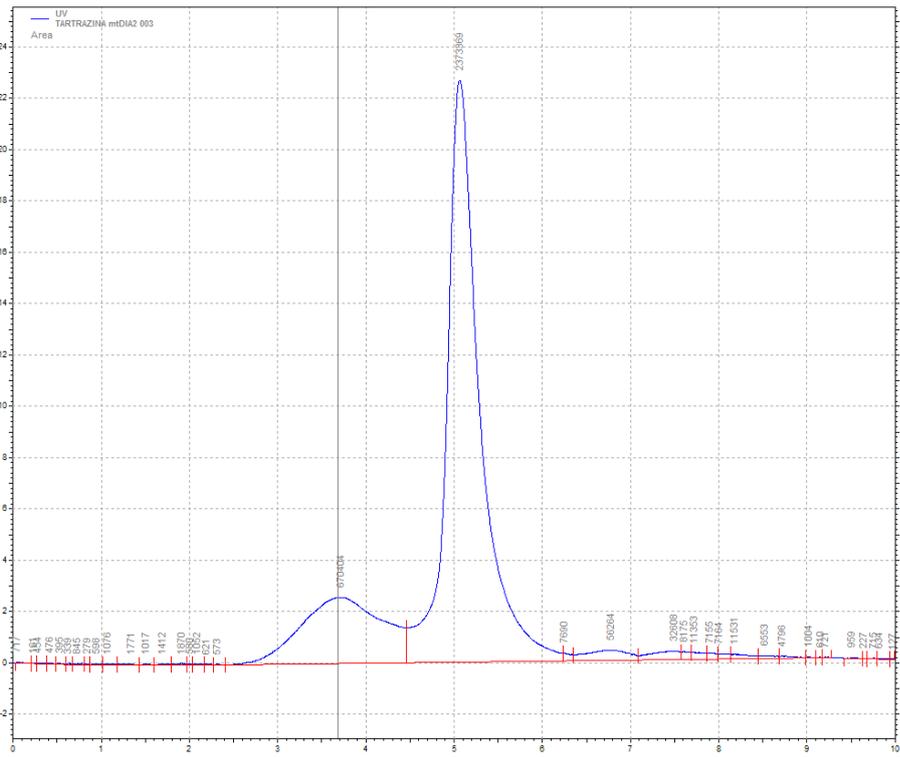
Tercera Curva:



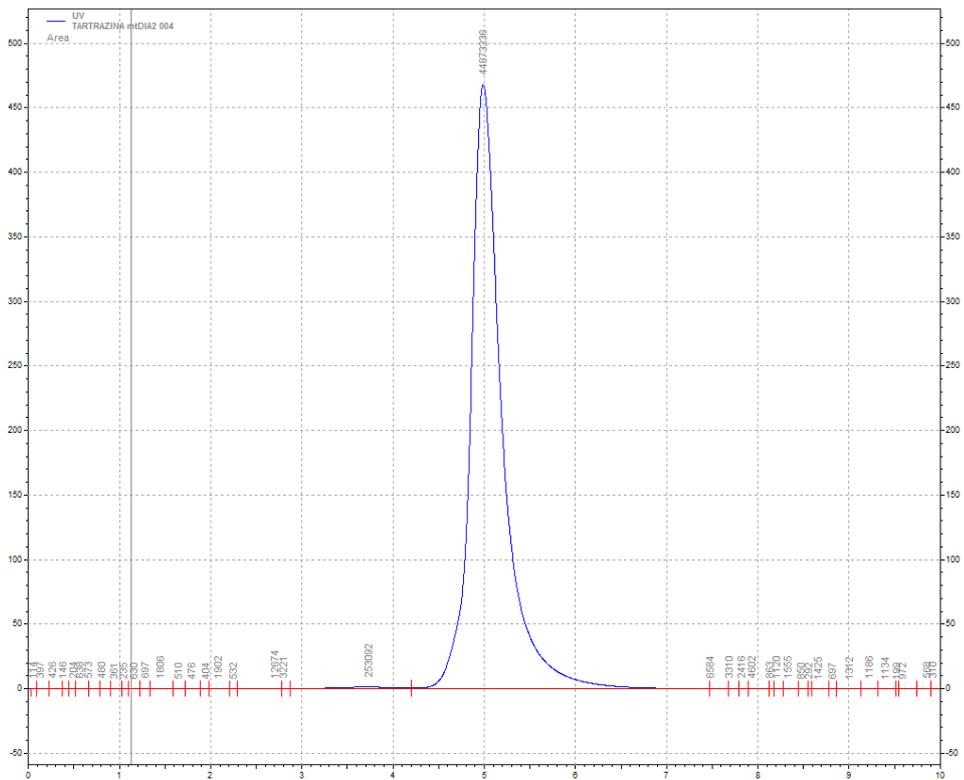




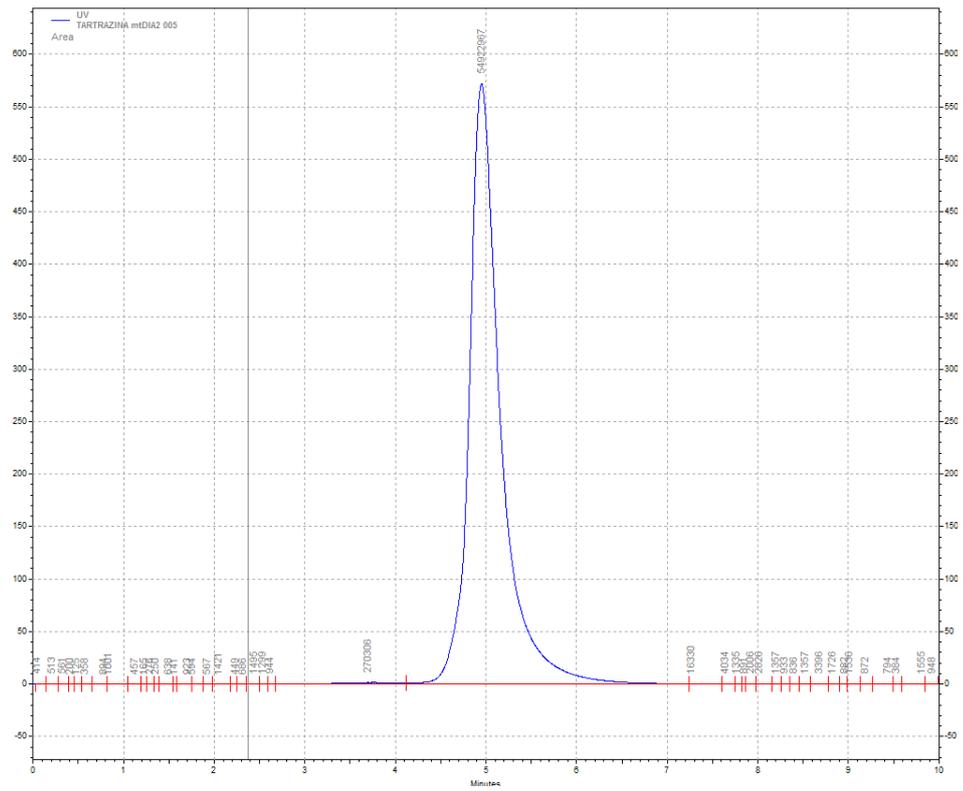
MUESTRA 1C



MUESTRA 1D



MUESTRA 1E



MUESTRA 1F

