

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACION DE AMARILLO N° 5 Y N° 6 EN BEBIDAS NO
CARBONATADAS COMERCIALIZADAS EN EL CAMPUS CENTRAL DE LA
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
EDWIN ORLANDO CHAVEZ CRUZ
ROLANDO DANIEL TORRES RIVERA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

AGOSTO, 2016

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINA

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA DE INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA

MAE. Nancy Zuleyma González Sosa

COORDINADORA DE ÁREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS

MAE. Ruano de Sandoval

DOCENTES ASESORES

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

MAE. María del Carmen Polío Martínez

AGRADECIMIENTOS

A NUESTROS DOCENTES ASESORES MSc. Ena Edith Herrera Salazar y MAE. María del Carmen Polío Martínez, por su tiempo, esfuerzo y paciencia en la dirección y el apoyo incondicional de nuestro trabajo de graduación, así como también por su amistad y cariño brindados desde un inicio.

AL PERSONAL DE LABORATORIO DE QUIMICA AGRICOLA Y ANALISIS INSTRUMENTAL Lic. Jorge Carranza por su apoyo, dedicación y amistad antes, durante y después de finalizar nuestras carreras.

A nuestras amigas y compañeras Brenda Sánchez y Mónica Guzmán por su ayuda incondicional en la adquisición de materiales de laboratorio para la realización de nuestra parte experimental además de brindarnos su amistad y apoyo constante.

Al Lic. Guillermo Castillo por la donación de placas cromatográficas y el apoyo en cuanto a procesos de la parte experimental y uso de equipos de laboratorio.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE SUELOS DEL CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL (CENTA) por permitirnos realizar nuestro servicio social en sus instalaciones, así como permitirnos utilizar la biblioteca institucional para el enriquecimiento bibliográfico de nuestro trabajo de graduación.

A TODOS NUESTROS DOCENTES DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA por su perseverante e incansable vocación pedagógica desde los inicios de nuestras carreras, ya que sin ello, nuestra formación profesional, personal y espiritual no hubiese sido posible.

Edwin - Daniel

DEDICATORIA

A MIS PADRES Lidia Claribel Rivera y José Rolando Torres, por darme el regalo de la vida, así como su apoyo, esfuerzo, cariño y amistad de manera constante, incondicional y perseverante durante toda mi vida, sin ellos no hubiera podido alcanzar mis metas en la vida.

A MIS HERMANOS Oscar Rolando Torres, Cyndy Beatriz Torres y Soraya Alicia Torres por brindarme consejos y apoyo en los peores momentos así como también su cariño y amor desde ahora y siempre.

A MIS SOBRINOS Oscar, Mariana y Alejandro Ayala Torres, por brindarme su cariño y amor todo el tiempo.

A NUESTRAS ASESORAS de tesis MSc. Ena Salazar y MAE. María del Carmen Polío Martínez por su dedicación y paciencia en la culminación de nuestro trabajo de graduación, que en un inicio parecía imposible

A TODOS MIS COMPAÑEROS, ahora amigos, hermanos y colegas que me acompañaron durante todos estos años, tanto desde un inicio de la carrera, como en la culminación de la misma, así también durante las interminables noches sin descanso, las preocupaciones estudiantiles.

A MI COLEGA, AMIGA, COMPAÑERA Y NOVIA Melissa Morataya por darme su apoyo, cariño y comprensión en las diferentes etapas de mi vida.

A MI GRAN AMIGO Y COMPAÑERO DE TESIS Edwin Chávez Cruz por haber estado juntos en esta aventura y desafío desde un inicio, así como el esfuerzo de su parte por alcanzar juntos el objetivo de terminar este trabajo.

Rolando Daniel Torres Rivera

DEDICATORIA

Primeramente dar gracias a Dios por su bendita sabiduría, misericordia y bendiciones que hasta el día de ahora he tenido, agradecerle por haberme ayudado a cumplir un logro más, ya que sin él no somos nada, dar le las gracias por haber puesto a las personas ideales en mi camino que siempre me han ayudado a seguir adelante.

A MIS QUERIDOS PADRES María Elena Cruz y Orlando Chávez Osorio por darme su apoyo, amistad, cariño y amor infinito que siempre me han brindado desde mi niñez hasta el día de ahora, ya que gracias a su educación he logrado llegar a ser la persona que soy y sin ellos no hubiese sido posible cumplir una meta más.

A MIS QUERIDOS HERMANOS Marvin Alexander Chávez Cruz y Karina Lisbeth Chávez Cruz por su amor, cariño, paciencia y apoyo en las buenas y en las malas y que siempre han tenido conmigo.

A MI QUERIDA TIA Doris y primos Carolina, Carlitos, Michel, Gabriel y su esposa Paty que siempre me brindaron su apoyo desde los inicios de mis estudios hasta el día de ahora.

A NUESTRAS ASESORAS DE TESIS MSc. Ena Salazar y Maestra María del Carmen Polío Martínez por su enorme dedicación, paciencia, enseñanza y apoyo por el que hemos podido lograr culminar nuestro trabajo de graduación.

A MIS QUERIDOS AMIGOS Carlos Escobar, Alex Chávez, Mila Gómez, Mely Gómez, Lucia Segura, Eli Rivas, Mainor Figueroa, Julio Galindo, Lily Martínez, Erika Ivonne, Erick Palma, Erika Josette, Cleo Duran, Alfredo Ayala, Sonia Vazquez, Karito Osorio, Sandra Romero, Gabriel Erazo, Monika Guzman, Daniela Melendez, Rossemary, Brenda Sanchez, Ing. Otto Cabrera e Ing. Alejandro Contreras que siempre me brindaron su apoyo para seguir adelante,

así como todas aquella de alguna manera siempre me apoyaron!! Muchas gracias.

A MI QUERIDO AMIGO Y COMPAÑERO DE TESIS Rolando Daniel Torres por haber aceptado este reto el cual sabíamos que no sería fácil pero que gracias a Dios lo hemos logrado, agradecerle la paciencia y esfuerzo que brindo desde el inicio hasta el final de nuestro trabajo.

Edwin Orlando Chávez Cruz

INDICE

	Pag
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xxii
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	27
3.1 Generalidades sobre aditivos alimentarios	27
3.1.1 Concepto de aditivo alimentario	27
3.1.2 Funciones y clasificación de los aditivos alimentarios	27
3.1.3 Regulación de los aditivos alimentarios	29
3.1.4 Aditivos que modifican el color	30
3.2 Historia de los colorantes	30
3.2.1 Generalidades sobre colorantes	31
3.2.2 Importancia de la certificación de los colorantes	31
3.2.3 Criterios que debe cumplir un colorante para que sea aplicado en un producto	32
3.3 Clasificación de los colorantes	33
3.3.1 Colorantes naturales de los alimentos	33
3.3.2 Colorantes sintéticos	35
3.4 Ventajas y desventajas de los colorantes naturales y sintéticos	38
3.5 Colorantes artificiales utilizados en bebidas	39
3.5.1 Amarillo N° 5 (Tartrazina)	39
3.5.2 Amarillo N° 6 (amarillo ocaso)	42
3.6 Bebidas no carbonatadas sin alcohol	44
3.7 Legislación internacional y nacional sobre los colorantes	44
3.7.1 Legislación internacional	44

3.7.2	Legislación Nacional	47
3.7.3	Información en las etiquetas	48
3.8	Implicaciones en la salud	49
3.8.1	Efectos secundarios	49
3.8.2	Colorantes en alimentos y bebidas que alteran la conducta infantil	50
3.9	Cromatografía	51
3.9.1	Definición	51
3.9.2	Fundamento	51
3.9.3	Historia	51
3.9.4	Absorbentes y eluyentes	52
3.9.5	Determinación de Rf	55
3.9.6	Estándares de referencia	57
3.9.7	Ubicación de los componentes	57
3.9.8	Cromatografía en capa fina (CCF)	58
3.9.9	Equipo y material necesario para cromatografía en capa fina	59
3.9.10	Cuantificación en cromatografía de capa fina (CCF)	60
3.10	Espectroscopia UV-VIS	61
3.10.1	Espectrofotometría de absorción	61
3.10.2	Utilidad comparativa de intervalos espectrales	62
3.10.3	Teoría espectro UV-VIS	63
3.10.4	Grupos cromóforos	64
3.10.5	Instrumentación para espectrometría UV-VIS	64
3.10.6	Fuentes luminosas	65
3.11	Análisis cuantitativo: Leyes de la absorción molecular	66
3.11.1	Ley de Lambert Beer	66
CAPITULO IV		
4.0	Diseño metodológico	68
4.1	Tipo de estudio	68

4.2 Investigación bibliográfica	68
4.3 Investigación de campo	69
4.4 Parte experimental	70
4.4.1 Determinación cualitativa de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C	70
4.5 Estructuración de la socialización de los resultados	75
CAPITULO V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	77
5.1 Selección de las marcas de bebidas	77
5.2 Resultados de encuesta dirigida a la población de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador	78
5.3 Resultados de la encuesta	80
5.4 Selección del puesto de venta y sabores a analizar de las tres marcas preferidas de bebidas no carbonatadas	86
5.5 Identificación y cuantificación de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en las bebidas no carbonatadas seleccionadas	86
5.6 Análisis estadístico de datos por el método de ANOVA	100
5.6.1 Análisis estadístico de datos (ANOVA) para el colorante amarillo N° 5.	100
5.6.2 Análisis estadístico de datos (ANOVA) para el colorante amarillo N° 6.	101
5.7 Socialización de los Resultados.	102
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	104
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pag
1	Funciones de diferentes aditivos utilizados en alimento	28
2	Colorantes naturales más utilizados en la industria alimenticia	34
3	Colorantes artificiales más utilizados en la industria alimentaria	37
4	Ventajas y desventajas de usar colorantes naturales o colorantes artificiales.	38
5	Límites máximos de uso colorantes en bebidas saborizadas no alcohólicas permitidas en México y en Argentina	46
6	Colorantes naturales permitidos en bebidas en El Salvador	47
7	Colorantes artificiales permitidos en bebidas en El Salvador	48
8	Adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía. Orden de elución, actividad de adsorbentes y fuerza de elución de los disolventes	54
9	Cromóforos característicos de algunos grupos funcionales nitrogenados.	64
10	Puntos de accesos al Campus Central de la Universidad de El Salvador y puestos de venta en cada uno de ellos.	77
11	Presentaciones, sabores y precios de las marcas de bebidas no carbonatadas que declaran amarillo N° 5 y N° 6 FD&C comercializadas en los accesos al Campus de la Universidad de El Salvador.	78
12	Razones por que la que algunas personas no consumen este tipo de bebidas no carbonatadas.	81

Cuadro N°		Pag
13	Marcas de bebidas no carbonatadas más consumidas por los encuestados.	81
14	Consumo de bebidas no carbonatadas por presentación.	82
15	Frecuencia de consumo de bebidas no carbonatas por la población encuestada.	83
16	Características por las que la población consume estas bebidas.	84
17	Cantidad de encuestados quienes tienen familiares que presentan problemas de salud relacionado al consumo de los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6.	85
18	Marcas y sabores seleccionados de bebidas no carbonatadas para los análisis.	86

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pag
1	Fórmula estructural del amarillo N° 5 (Tartrazina)	39
2	Fórmula estructural del amarillo N° 6 (amarillo ocaso)	42
3	Aspecto clásico de una placa cromatográfica (TLC) después del revelado de las manchas de migración.	56
4	Cámara de desarrollo con cubeta vertical y placa de TLC.	57
5	Aparato de aplicación automático en TLC y densitómetro lector de placa Scanner-3	61
6	Intervalo de longitud de onda del espectro Visible.	62
7	Aspectos distintos de espectros registrados en la región UV-Vis. Espectros del benceno (a) en disolución (espectro en bandas); (b) en estado de vapor (espectro que presenta un estructura final)	63
8	Instrumentación para espectrofotometría UV-Vis. Dos modalidades de instrumentos que originan un espectro mediante dos procedimientos diferentes.	65
9	Grafica de la cantidad de encuestados que consumen bebidas no carbonatadas con sabor artificial que rotulan los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.	80
10	Gráfica de las marcas de bebidas no carbonatadas que son consumidas con mayor frecuencia por la población encuestada.	82
11	Gráfica de la cantidad de bebidas no carbonatadas consumidas por la población encuestada.	83
12	Gráfica de la frecuencia de consumo de bebidas no carbonatadas por los encuestados.	84

Figura N°		Pag
13	Características por las que la población consume este tipo de bebidas.	85
14	Desplazamiento de los colorantes contenido en las muestras del Jugo Del Valle mandarina (izquierda) y naranja (derecha) y sus estándares en la placa de cromatográfica de sílica gel.	88
15	Curva de estándares para el colorante amarillo N° 5 de la prueba preliminar i.	90
16	Curva de estándares para el colorante amarillo N° 6 de la prueba preliminar i.	91
17	Curva de calibración para estándares de amarillo N°6 FD&C. usando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 60 F ₂₅₄ en base de aluminio	94
18	Curva de estándares de amarillo N°5 utilizando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 60 F ₂₅₄ en base de aluminio.	96
19	Curva de calibración para los estándares de Amarillo N°6 utilizando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 60 F ₂₅₄ en base de aluminio.	98

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pag
1	Desplazamiento y Rf de los estándares y muestras de amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en las placas cromatográficas.	88
2	Resultados de la absorbancia de los estándares y las muestras para los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.	90
3	Concentraciones de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C contenido en las bebidas de la marca del Valle con sabor a mandarina y naranja.	92
4	Resultados de Rf y absorbancia de estándares para amarillo N° 6 FD&C.	93
5	Resultados de absorbancias y Rf de la marca comercial Súper Juoó que rotula los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.	94
6	Rf de los estándares de amarillo N° 5.	96
7	Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la marca Súper Juoó sabor naranja para el amarillo N° 5 FD&C.	97
8	Resultado para los estándares de amarillo N° 6.	97
9	Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la marca Súper Juoó sabor naranja para el amarillo N° 6 FD&C.	98
10	Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la marca Frutado sabor durazno para el amarillo N° 6 FD&C.	99
11	Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la marca Del Valle sabor mandarina para el amarillo N° 6 FD&C.	99
12	Resultados finales de las concentraciones de las tres bebidas no carbonatadas que rotulan los colorantes amarillo N° 5 y N° 6	100

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Mapa del campus central de la universidad de el salvador con sus respectivos accesos.
- 2 Lista de chequeo para el trabajo de graduación titulado “determinación de amarillo N° 5 y N° 6 en bebidas no carbonatadas comercializadas en los accesos del Campus Central de la Universidad de El Salvador”
- 3 Encuesta para el trabajo de graduación titulado: “determinación de amarillo N° 5 y N° 6 en bebidas no carbonatadas comercializadas en los alrededores del Campus Central de la Universidad de El Salvador”
- 4 Resultados de la encuesta estudiantil para conocer las marcas, cantidad, frecuencia de consumo y conocimiento acerca de los colorantes artificiales utilizados en bebidas no carbonatadas con sabor artificial de mayor consumo realizada en la Facultad de Química y Farmacia
- 5 Materiales, equipos y reactivos para la extracción, identificación y cuantificación de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6
- 6 Formato para la recolección de datos.
- 7 Método modificado de Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para la identificación de los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6 FD & C.
- 8 Método para la determinación de colorantes sintéticos en productos alimenticios.
- 9 Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.18.01:01 Productos Alimenticios. Bebidas No Carbonatadas Sin Alcohol. Especificaciones.
- 10 Etiquetas de bebidas no carbonatadas analizadas

ANEXO N°

- 11 Análisis de varianza de un factor (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa en la concentración de Amarillo N° 5 y N° 6 en cada una de las bebidas analizadas.
- 12 Diapositivas utilizadas en la charla educativa
- 13 Cálculos para determinar las concentraciones de amarillo N° 5 y N° 6 en las tres marcas de bebidas analizadas.
- 14 Fotografías de las diferentes etapas de la investigación.
- 15 Espectros de identificación para los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 en las bebidas analizadas.
- 16 Fotografías de la charla educativa.
- 17 Certificado de Análisis de placas cromatográfica prefabricadas en base de aluminio con silica gel F₂₅₄.

ABREVIATURAS

AOAC:	Association of Official Analytical Chemists
CCF:	Cromatografía en capa fina.
CENTA:	Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FDA:	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés
FD&C:	Uso permitido para alimentos, medicamentos y cosméticos, por sus siglas en inglés.
IDA:	Ingesta diaria admisible.
IR:	Región infrarroja de la luz
mg:	Miligramo
mL:	Mililitro
NSO:	Norma Salvadoreña Obligatoria.
OMS:	Organismo Mundial de la Salud
PPM:	Partes por millón
Rf:	Factor de reparto
TLC:	Cromatografía de capa fina, por sus siglas en inglés.
UV:	Región ultravioleta de la luz
UV-Vis:	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

La mayoría de alimentos que consumimos hoy en día, contienen colorantes artificiales que son incorporados de manera intencional para mejorar las propiedades físicas de dichos alimentos siendo un aspecto tecnológico y estético ya que no aportan ningún valor nutricional al producto e incluso pueden llegar a causar alergias en algunas personas especialmente en niños. El uso de los colorantes está reglamentado en cada país, en El Salvador caso existe la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.18.01:01 Productos Alimenticios. Bebidas No Carbonatadas Sin Alcohol. La cual regula el uso y la cantidad máxima de colorante que puede ser utilizado en este tipo de alimentos.

En el presente trabajo de graduación se realizó la identificación y cuantificación de los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6 contenidos en bebidas no carbonatadas comercializadas en los alrededores del Campus Central de la Universidad de El Salvador. Por medio de una lista de chequeo se conocieron las marcas comercializadas en dichos sitios, posteriormente se realizó una encuesta piloto dirigida al personal docente, administrativo y estudiantil de la Facultad de Química y Farmacia con el objetivo de determinar estadísticamente el número total de encuestas a realizar, en una muestra de 20 personas elegidas aleatoriamente. Se determinó estadísticamente como resultado un número representativo de 119 personas, para conocer su preferencia en cuanto al consumo de dichas bebidas, y a partir de estos resultados se seleccionaron las tres marcas comerciales de bebidas no carbonatadas de mayor consumo por la población.

Las tres marcas de bebidas fueron adquiridas en la entrada cercana a la Facultad de Odontología por ser la más próxima a la Facultad de Química y Farmacia, tomando como criterio que en la etiqueta rotularan los colorantes en estudio. Se eligió aleatoriamente un sabor de cada marca comercial de bebida,

las cuales fueron Jugos del Valle sabor mandarina, Súper Juoo sabor naranja, y Frutado sabor durazno, realizándose un pool con seis envases de cada bebida para que la muestra fuese representativa.

Posteriormente haciendo uso del método modificado de la AOAC para colorantes artificiales ⁽²⁾ se realizaron tres extracciones de los colorantes de cada pool de bebida haciendo uso de lana de oveja desengrasada. Aplicando tres réplicas de cada extracción y se identificaron por cromatografía de capa fina y se cuantificaron por espectrofotometría UV-Vis utilizando una curva de calibración para cada colorante.

Se realizó una charla educativa dirigida a la población de la Facultad de Química y Farmacia para dar a conocer los resultados obtenidos de esta investigación e informar sobre las posibles consecuencias a la salud por el consumo de los colorantes investigados.

Según los resultados obtenidos las concentraciones de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 no sobrepasan el límite establecido en la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 18.67.01:01 Productos Alimenticios. Bebidas No Carbonatadas Sin Alcohol, por lo cual su consumo no representa un riesgo para la salud sin embargo el consumo de otros productos que contengan estos colorantes artificiales, aumenta la concentración de colorantes ingeridos pudiendo sobrepasar los límites de ingesta diaria admisible establecidos, y provocar daños a la salud.

Los análisis descritos anteriormente se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador durante los meses de Agosto a Septiembre del año 2015.

**CAPITULO I
INTRODUCCION**

1.0 INTRODUCCION

La mayoría de alimentos que consumimos hoy en día contienen colorantes artificiales que son incorporados de manera intencional para mejorar las propiedades físicas de dichos alimentos, ya que el color es la primera impresión que los consumidores valoran al momento de adquirir un producto; no obstante, los colorantes (naturales y artificiales) no son más que un aspecto tecnológico y estético, ya que no aportan ningún valor nutricional al producto e incluso pueden llegar a causar alergias en algunas personas especialmente en niños⁽¹³⁾, por lo que es muy importante conocer lo que contienen los alimentos que se consumen.

La presente investigación tuvo como objetivo determinar y cuantificar los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 en bebidas no carbonatadas comercializadas en los alrededores del Campus Central de la Universidad de El Salvador. Se realizó un sondeo mediante una lista de chequeo con el fin de conocer las marcas comerciales de las bebidas no carbonatadas que rotulaban en su etiqueta el contenido de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6, posteriormente se realizó una encuesta a la población de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador para seleccionar las tres marcas de bebidas en una muestra de 119 personas. Las tres marcas de bebidas fueron adquiridas en la entrada cercana a la Facultad de Odontología, ya que es la más próxima a la Facultad de Química y Farmacia, tomando como criterio que en su etiqueta declararan el contenido de los colorantes en estudio, eligiéndose aleatoriamente de esta manera un sabor de cada marca comercial de bebida, adquiriéndose seis envases de cada presentación, las cuales fueron jugos del Valle sabor mandarina, Super Juoo sabor naranja y Frutado sabor durazno, realizándose un pool con los seis envases de cada bebida para que la muestra fuese representativa.

La extracción de los colorantes se realizó según el método modificado de la AOAC para colorantes artificiales (2), se realizaron tres extracciones de los colorantes de cada pool de bebida, haciendo uso de lana de oveja desengrasada, realizándose tres réplicas de cada extracción. La identificación de los colorantes se realizó por cromatografía en capa fina y la cuantificación se realizó por espectrofotometría UV-Visible.

Con los resultados obtenidos se verificó el contenido establecido de colorantes según la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.18.01:01 Productos alimenticios. Bebidas no Carbonatadas sin Alcohol, y posteriormente se realizó una charla dirigida a la población de la Facultad de Química y Farmacia para dar a conocer los resultados obtenidos de esta investigación e informar sobre las posibles consecuencias a la salud por el consumo excesivo de los colorantes investigados.

La parte experimental de esta investigación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en los meses comprendidos de Agosto a Septiembre del año 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar amarillo N° 5 y N° 6 en bebidas no carbonatadas comercializadas en el Campus Central de la Universidad de El Salvador.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Inspeccionar mediante una lista de chequeo las diferentes marcas comerciales y presentaciones de bebidas no carbonatadas que declaren los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 comercializadas en los accesos del Campus Central de la Universidad de El Salvador.
- 2.2.2 Realizar una encuesta dirigida a la población de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador a fin de conocer las tres marcas de bebidas no carbonatadas de mayor consumo identificadas mediante la lista de chequeo.
- 2.2.3 Seleccionar aleatoriamente un sabor de cada marca de bebidas no carbonatada preferida por la población de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador que declare en su etiqueta el contenido de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6.
- 2.2.4 Identificar y cuantificar los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 en las bebidas no carbonatas preferidas por la población encuestada.
- 2.2.5 Dar a conocer los resultados obtenidos de la investigación y los daños a la salud provocados por estos dos colorantes artificiales a la población de la Facultad de Química y Farmacia mediante una charla educativa.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Generalidades sobre aditivos alimentarios.

3.1.1 Concepto de aditivo alimentario ⁽¹⁾

Según el Codex Alimentarius, un aditivo alimentario es cualquier sustancia que normalmente no se consume como alimento por sí misma ni se usa como ingrediente de este, tenga o no valor nutricional y es agregado de manera intencional en los alimentos como un propósito tecnológico (incluyendo organoléptico) en la manufactura, procesamiento, preparación, tratamiento, empaque, transporte o almacenamiento resulta o puede resultar (directa o indirectamente) en su incorporación (o la de algún derivado) como componente del alimento o afectar de algún modo las características de dicho alimento.

El Codex Alimentarius, establece que el uso de aditivos alimentarios es justificado si ofrece ventajas, no presenta riesgos ni induce a confusión en los consumidores.

3.1.2 Funciones y clasificación de los aditivos alimentarios ^(1,4)

Los aditivos alimentarios tienen un papel fundamental a la hora de mantener las cualidades y características de los alimentos que están sometidos a condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, microorganismos) que pueden modificar su composición original.

Muchos aditivos alimentarios son sustancias naturales, e incluso nutrientes esenciales. Químicamente pertenecen a grupos funcionales muy diversos, entre ellos sales inorgánicas, aminoácidos, hidratos de carbono y enzimas.

Los aditivos alimentarios se clasifican según su función ver Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Funciones de diferentes aditivos utilizados en alimentos ⁽¹⁾

FUNCIÓN	ADITIVO
Evitar el deterioro del alimento	Antioxidantes y conservantes
Modificar la textura	Espesantes y gelificantes, emulsionantes y estabilizantes.
Modificar el sabor y/o el aroma	Aromatizantes y saborizantes, resaltadores del sabor, edulcorantes.
Modificar el color	Colorantes y estabilizantes del color
Modificar otras propiedades (consistencia, textura, acidez)	Antiespumante, humectantes, reguladores de la acidez, acidulantes.
Procesamiento de materias primas; iniciación de reacciones químicas en la producción del alimento	Enzimas
Suplemento nutricional	Calcio, vitaminas, sulfato ferroso, omega 3, yodo

El Codex alimentarius ha elaborado una nueva normativa que establecen las clases funcionales de aditivos y un sistema de identificación internacional con la asignación de un código numérico a cada aditivos. Sistema Internacional para Aditivos Alimentarios (INS). Además se exige que los aditivos empleados para realzar o mejorar un alimento no deben enmascarar materia prima defectuosa o fallas en alguna etapa de elaboración.

En los países de la Unión Europea, los aditivos alimentarios autorizados se designan mediante un código, formado por la letra E y un número de tres o cuatro cifras.

- E100-E180 Colorantes
- E200- E297 Conservantes
- E900-E999 Ceras, gases y edulcorantes
- E400-E495 Gelificantes, estabilizantes y espesantes
- E300-E385 Antioxidantes
- Superior E1000 Derivados del almidón.

3.1.3 Regulación de los aditivos alimentarios ^(1,4)

El uso de los aditivos está rigurosamente reglamentado tanto nacional como internacionalmente. A nivel internacional, hay un Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS) que a partir del análisis y revisión de todos los datos toxicológicos disponibles, determina la inocuidad y la "*ingesta diaria admisible*" (IDA) para cada aditivo, es decir el nivel máximo que no tenga efectos tóxicos demostrables, expresada en relación con el peso corporal, que una persona puede ingerir diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para su salud (se refiere normalmente a un persona estándar de 60 kg de peso).

La mayoría de países tienen sus propios reglamentos y lista de colores permitidos que se pueden utilizar en diversas aplicaciones, incluyendo los límites máximos de ingesta diaria.

La autorización para el empleo de aditivos es distinta en cada país, pero requiere unos principios generales como son:

- Justificación de su empleo.
- Pureza química.
- Datos toxicológicos.

Existen distintas razones que justifican el uso de aditivos y coadyuvantes tecnológicos.

- Razones económicas y sociales
- Razones sanitarias
- Razones fisiológicas
- Razones tecnológicas

3.1.4 Aditivos que modifican el color ⁽¹⁾

Los aditivos alimenticios que modifican el color son llamados colorantes y pueden definirse como sustancias que aportan, intensifican o restauran el color de un producto para compensar la pérdida de color debida al almacenamiento o procesamiento, o a las variaciones naturales de la materia prima, y para realzar los colores naturales de los alimentos. Son ampliamente usados en repostería, golosinas, jugos de frutas y gaseosas, galletitas, helados, etc.

El objetivo de usar colorantes en los alimentos es mejorar su aspecto visual y poder dar respuesta a las expectativas del consumidor. Bajo ninguna razón se puede utilizar un colorante para ocultar o disimular fallas en el producto.

3.2 Historia de los colorantes ⁽⁵⁾

Antiguamente las únicas fuentes de colorantes en alimentos eran de origen vegetal, animal y mineral, incluyendo zanahorias, azafrán, flores y sales de hierro y cobre. Un aditivo de color, tal como se define, es cualquier tinte, pigmento, u otra sustancia que puede dar color a los alimentos, medicamentos, cosméticos o al cuerpo humano. Los antiguos egipcios utilizaban colorantes artificiales en cosméticos y tintes para el cabello. El vino fue coloreado artificialmente al menos 300 años antes de Cristo.

En 1856, William Henry Perkin descubrió el primer tinte orgánico sintético, llamado malva. Los descubrimientos de tintes similares siguieron pronto y rápidamente se acostumbraron a colorear alimentos, medicamentos y cosméticos. Debido a que estos tintes se produjeron primero a partir de subproductos de procesamiento de carbón, eran conocidos como "los colores de alquitrán de hulla".

3.2.1 Generalidades sobre colorantes ^(1,17)

Los colorantes forman uno de los grupos de aditivos alimentarios mayormente utilizados y que también tiene grandes diferencias en cuanto al uso en los diferentes países. En la Unión Europea está prácticamente prohibido el uso de colorantes artificiales, mientras que en países como Estados Unidos la mayoría están autorizados para su uso en alimentos. Generalmente la gente asocia colores con sabores y juzga previamente la calidad de los productos en base al color, es decir este influye también psicológicamente en el sabor percibido en los productos, por esta razón los fabricantes de alimentos añaden colorantes a sus productos, haciéndolos más atractivos.

Técnicamente es considerado como colorante cualquier tinte, pigmento o sustancia que puede impartir color cuando se agrega o aplica a un alimento, bebida, fármaco, cosmético o al cuerpo humano.

3.2.2 Importancia de la certificación de los colorantes ⁽²¹⁾

En 1906 Estados Unidos adoptó a través del acta de Alimentos y Fármacos, la prohibición del uso de colorantes venenosos o adulterados en confitería, así como el coloreado de alimentos con el fin de ocultar calidad inferior o defectos del mismo. Por ellos surgen organismos como la FDA, y es para estos organismos que el proceso de certificación de un color es necesario ya que es una forma efectiva de controlar el ingreso de este ingrediente y avalar que el color que ingresa a los Estados Unidos es seguro.

En los Estados Unidos se utilizan números (que generalmente indican que la FDA ha aprobado el colorante para su uso, en alimentos, medicamentos y cosméticos) y letras como la FD & C (Food, Drugs and Cosmetics) para los colorantes alimentarios sintéticos aprobados que no existen en la naturaleza, mientras que en la Unión Europea, utilizan la letra “E” seguida de un número los cuales se utilizan para todos los aditivos, tanto sintéticos como naturales

aprobados en aplicaciones alimentarias. De esta manera se lleva un control de calidad de los colores contenidos en los productos que ingresan como alimentos, fármacos y cosméticos.

El uso de un color aditivo no listado, el uso inadecuado o el uso de un color aditivo que no es conforme a la pureza e identificación de acuerdo a las especificaciones de la regulación listada, puede causar que un producto sea considerado como adulterado de acuerdo a lo previsto en la Acta FD & C y la FDA puede tomar acciones contra este producto. Por ello el proceso de certificación cobra un valor importante sobre la seguridad y confianza que pueda tener dicho ingrediente o en los alimentos que lo contienen.

3.2.3 Criterios que debe cumplir un colorante para ser aplicado en un producto ^(15,19)

Para que un colorante se pueda emplear en una aplicación específica debe satisfacer varios criterios:

- Ser seguro en los niveles y en las condiciones de uso.
- No impartir efectos adversos al producto
- Ser estable en el producto
- No reaccionar con los productos ni con los envases donde se apliquen
- Ser de fácil aplicación al producto
- Tener un fuerte poder tintóreo.

Los colorantes para alimentos pueden ser naturales o sintéticos. Estos últimos tienen mejores propiedades de estabilidad y poder tintóreo por lo que su uso es más generalizado.

En la evaluación toxicológica de los colorantes sintéticos se exige como mínimo los siguientes datos:

- Estudios sobre metabolismo efectuados en diversas especies. Estos estudios deben versar sobre la absorción, la distribución, la biotransformación y la eliminación del producto; en cada una de esas fases hay que tratar de identificar los productos metabólicos.
- Estudios a corto plazo de administración del producto en especies de mamíferos no roedores.
- Estudios multigeneracionales de reproducción/ teratogenia.
- Estudios a largo plazo de carcinogenia / toxicidad en dos especies.

3.3 Clasificación de los colorantes.

3.3.1 Colorantes naturales de los alimentos ^(4,6)

Los colorantes naturales pueden ser de origen animal, vegetal y mineral y se encuentran representados por los 3 colores primarios (rojo, verde y azul) y muchas de sus combinaciones se observan en casi todos los colores del espectro visible por ejemplo amarillo, naranja, violeta, etc.

En el caso de los alimentos coloreados a partir de extractos de plantas, frutas, etc., también se consideran como natural al igual que los colorantes producidos por fermentación y los sintetizados por algunos microorganismos (levaduras, hongos y bacterias) en diferentes medios de cultivos, por ejemplo, los carotenoides y las antocianinas. La mayoría de los colorantes naturales para alimentos se clasifican en cinco grupos básicos: tetrapirroles (clorofila); isoprenoides o carotenoides (carotenos, licopeno y xantofilas); benzopireno (antocianinas y flavonoides); betalaínas (betacianinas y betaxantinas) y otros derivados de algún proceso (caramelo y siropes). Algunos de los colorantes más utilizados en la Unión Europea se mencionan en el Cuadro Nº 2.

Cuadro N° 2 Colorantes naturales más utilizados en la industria alimenticia (9)

NOMBRE	OBTENCIÓN	APLICACIÓN	EFFECTOS Y LÍMITES.
Curcumina	Rizoma de la cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	Color amarillo intenso (<i>Curry</i>). Confituras, mermeladas, etc. Embutidos picados (crudos y cocidos).	Baja absorción en el intestino, Toxicidad reducida. En algunos experimentos realizados con animales se han observado efectos teratógenos.
Cochinilla Carmín Ácido carmínico.	Hembras del insecto <i>Dactylopusco-ccus</i> , parásitos de algunas especies de cactus.	Color rojo muy variable, utilizándose en conservas vegetales, mermeladas, helados, productos cárnicos y bebidas alcohólicas y no alcohólicas.	Se han señalado respuestas alérgicas en sujetos que han consumido bebidas con este colorante. IDA: sin asignar.
Clorofilas	Algas	Color verde característico aplicado a chicle, helados y bebidas refrescantes.	Baja absorción intestinal. IDA: sin asignar.
Carotenoides	Capsantina: pimiento rojo y del pimentón Licopeno: tomate.	Fabricación de embutidos Bebidas refrescantes	Absorción intestinal muy baja. IDA: 5 mg/Kg peso.
Rojo de remolacha Betaína	Remolacha roja (<i>Betavulgaris</i>)	Productos de repostería, helados y derivados lácteos dirigidos al público infantil. Bebidas refrescantes, conservas, vegetales y mermeladas, conservas de pescado.	Baja absorción intestinal. El colorante absorbido se elimina sin cambios por la orina

Entre los factores que influyen al momento de tomar la decisión de utilizar un colorante natural, y que se relacionan con los principales desafíos en su utilización se pueden mencionar:

- Costo mayor que el de su equivalente sintético.

- Estabilidad del color y su dependencia de factores tales como pH, temperatura, exposición a la luz y reacciones de oxidación con otros ingredientes.
- Uniformidad del color durante el procesamiento y almacenaje del alimento.
- Durabilidad del color y alteración del sabor durante el período de almacenaje del alimento.
- Inocuidad y propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a algunos pigmentos naturales.

3.3.2 Colorantes sintéticos ^(5, 23)

Los primeros colores se prepararon con anilina, y por muchos años todos los colorantes de alquitrán de hulla fueron llamados colores de anilina, cualquiera que fuese su origen. Los colorantes de alquitrán forman más de una docena de grupos bien definidos entre los cuales se hallan los colorantes nitrosos, los nitrocolorantes, los colorantes azoicos (aminas, oxazinas y tiazinas), los indigoides, las antraquinonas, las acridinas, las quinolinas, etc.). También se dividen en colorantes ácidos y básicos, en colorantes directos y colorantes con mordientes.

La mayor parte de ellos se utilizan para teñir telas y para diversos fines en las artes. Muchos de estos colorantes se emplearon originalmente en alimentos y bebidas sin hacer la debida selección entre los inofensivos y los tóxicos y sin que hubiese ninguna inspección tocante a pureza o falta de toxicidad. Después de la publicación de la ley sobre alimentos y drogas (1906), la Secretaria de Agricultura de los Estados Unidos dicto disposiciones y reglamentos en cuya virtud algunos colorantes vinieron a ser conocidos con el nombre de “Colorantes permitidos”.

Estos colores solo se deben usar después que la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) certifica que son genuinos y no contienen impurezas venenosas; de ahí el nombre de colores certificados o permitidos, cuya aceptación es limitada, ya que varios se han retirado de la lista y se han encontrado sustitutos.

Los siete colorantes artificiales que están permitidos en los alimentos bajo la Ley de 2007 en Estados Unidos son los siguientes:

- FD & C Azul N° 1. Azul brillante FCF, E133 (azul sombra)
- FD & C Azul N° 2. Indigotina, E132 (azul marino sombra)
- FD & C Verde N°3. Verde ligero FCF, E143 (tono verde azulado)
- FD & C Rojo N°40. Rojo Allura AC, E129 (tono rojo)
- FD & C Rojo N°3. Eritrosina, E102 (sombra rosa)
- FD & C Amarillo N°5. Tartrazina, E102 (sombra amarilla)
- FD & C Amarillo N°6. Amarillo anaranjado S, E110 (tono naranja)

Los colorantes sintéticos se pueden clasificar en dos grandes grupos, según sus propiedades físicas y químicas, en colorantes hidrosolubles y lacas.

a) Colorantes hidrosolubles ⁽¹⁵⁾

Los colorantes hidrosolubles se caracterizan por su elevada solubilidad en una gran diversidad de solvente incluyendo el agua y por lo tanto, su poder de coloración se basa en la disolución. Los colorantes hidrosolubles más utilizados se muestran en el Cuadro N° 3.

Las aplicaciones más comunes de los colorantes hidrosolubles son bebidas, gaseosas y refrescos en polvo; confitería, helados y productos lácteos; conservas y mermeladas; sopas, vegetales y frutas enlatadas; postres y productos horneados.

Cuadro N° 3. Colorantes artificiales más utilizados en la industria alimentaria (1)

COLORANTES	USOS
Tartracina Amarillo.	Confiere color amarillo a las bebidas limonadas, helados, caramelos, repostería a la paella y arroz condimentado envasado.
Amarillo anaranjado S	Se utiliza para colorear refrescos de naranja, helados, caramelos, productos para aperitivo, postres, etc.
Azorrubina o carmoisina eritrosina	Otorga color frambuesa en caramelos, helados, postres, etc. Se utiliza el amaranto para el color rojo en gelatinas.
Azul V, indigotina, verde lisamina	Otorgan colores celeste, verde e índigo a bebidas refrescantes, golosinas, coberturas de repostería, helados, etc.

b) Lacas (15,23)

Las lacas son colorantes prácticamente insolubles en la mayoría de las sustancias y su poder de coloración se basa en la dispersión del color en el medio en el cual se aplica. Estas se producen a partir de la precipitación y absorción de un colorante hidrosoluble en una base insoluble o sustrato. Por lo tanto, constan de dos elementos constituyentes básicos: un material colorante y una base o portador.

Según la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, las lacas para alimentos se pueden producir únicamente sobre un sustrato de hidróxido de aluminio. Por supuesto, las condiciones más críticas son aquellas empleadas para las lacas destinadas a alimentos, drogas y cosméticos.

Las principales aplicaciones de las lacas son en productos en polvo, como gelatinas y refrescos; rellenos y mezclas de tortas, pasteles y galletas, grasas y ceras; tabletas comprimidas y gomas de mascar.

3.4 Ventajas y desventajas de los colorantes naturales y sintéticos ⁽¹⁷⁾

Los colorantes para alimentos pueden ser naturales o sintéticos. Estos últimos tienen mejores propiedades de estabilidad y poder tintóreo por lo que su uso es más generalizado.

Tanto los colorantes sintéticos como los pigmentos naturales poseen ventajas y desventajas (ver cuadro N° 4) que deben de tomarse en cuenta para su uso en la industria de alimentos. Aunque los colorantes sintéticos brindan un color más llamativo que los naturales; no hay que perder de vista el daño que pudieran ocasionar en la salud de los consumidores.

Cuadro N° 4. Ventajas y desventajas de usar colorantes naturales o colorantes artificiales.

COLORANTES	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Colorantes artificiales	Mayor poder tintóreo. Mayor estabilidad en las condiciones de procesado y almacenamiento Solubles en agua Insolubles en agua (lacas) Presentación líquida y sólida	Produce efectos en la salud como alergias, cáncer, hiperactividad y déficit de atención en niños.
Colorantes naturales	No producen efectos en la salud	Carecen de fuerza tintórea Aportan sabores no deseados al producto

3.5 Colorantes artificiales utilizados en bebidas.

3.5.1 Amarillo N° 5 (Tartrazina) ^(10, 23)

FD & C Amarillo N° 5 (Figura N° 1), también conocido como tartrazina, es utilizado en numerosos productos de panadería, bebidas, polvos de postre, caramelos, cereales, postres de gelatina, alimentos para mascotas, y muchos otros alimentos, así como productos farmacéuticos y cosméticos. Su uso está autorizado, en más de 60 países, entre los que incluye la Comunidad Económica Europea y Estados Unidos.

El aditivo colorante FD & C Amarillo N° 5 es principalmente la sal trisódica 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-4-[4-sulfofenil-azo]-1H-pirazol-3-carboxílico (CAS Reg. N° 1934-21-0).

Para fabricar el colorante, el ácido 4-amino-bencenosulfónico se diazota con ácido clorhídrico y nitrito de sodio. El compuesto diazo resultante se acopla con ácido 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-1H-pirazol-3-carboxílico o con el éster de metilo, éster de etilo, o una sal de este ácido carboxílico. El colorante resultante se purifica y se aísla como la sal de sodio.

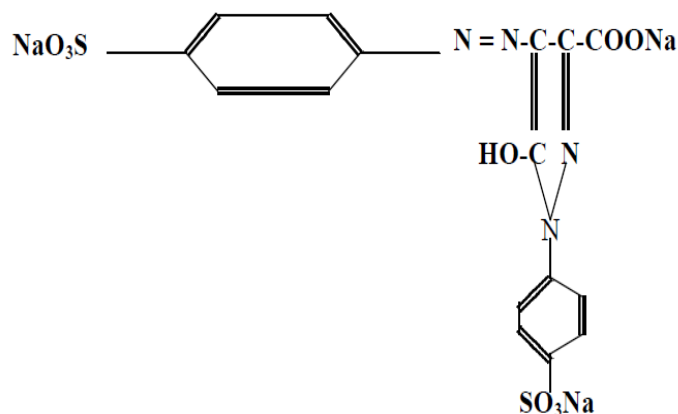


Figura N° 1. Fórmula estructural del amarillo N° 5 (Tartrazina)

Se debe rotular de manera destacada en los alimentos que lo contienen, por su potencial toxicidad. Pertenece al grupo de los colorantes azoicos, del tipo monoazo-(pirazolona), consiste esencialmente de 5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonato fenilazo)-H-pirazol-3-carboxilato trisódico, en presencia de cloruro y/o sulfato de sodio como el principal componente no coloreado.

Se presenta en forma de polvo o gránulos de color naranja claro, es soluble en agua e insoluble en etanol. La estabilidad de este colorante es muy buena, ya que no se ve afectado al ser expuesto al calor, a la luz, a ácidos y álcalis.

Después del rojo N° 40, es el colorante más utilizado. La IDA para el colorante Amarillo N° 5 es de 5 mg / kg / día (FDA), lo que equivale a 150 mg / día para un niño de 30 kg. Las empresas estiman un consumo de equivalente a 15 mg de este colorante por personas por día, pero cuando en realidad hay muchos niños que consumen varias veces esa cantidad.

- Metabolismo y efectos metabólicos.

Ácido sulfanílico es un metabolito que resulta de la reducción del amarillo N° 5 en el enlace N = N azo, sin embargo cuando el amarillo N° 5 fue administrado con Carbono 14 radioactivo (¹⁴C) por vía intraperitoneal en ratas y conejos, no se encontraron restos de ácido sulfanílico radioactivo en la orina.

En el mismo estudio, cuando el Amarillo N° 5 se administró por vía oral a ratas, conejos y seres humanos, se observaron pocos cambios ya que se recuperó en la orina el ácido sulfanílico. Estos resultados indican que la reducción de Amarillo N° 5 se produce a través de la flora gastrointestinal. Es por ello que el ácido sulfanílico se excreta en la orina cuando el Amarillo N° 5 se administra por vía oral, pero no por vía intraperitoneal se metaboliza principalmente en los intestinos de las ratas después de una dosis oral, donde el microflora intestinal realizan la mayor parte de la degradación del compuesto.

Aparte del metabolismo del colorante, una dosis de 50 mg de tartrazina condujo a un aumento o acelerada excreción urinaria de zinc en los niños hiperactivos. Si el efecto sobre el zinc es una causa de la hiperactividad no se conoce.

- Contaminantes cancerígenos.

El Amarillo N° 5 puede estar contaminado con varios agentes cancerígenos, incluyendo bencidina y 4-aminobifenilo. La FDA limita bencidina libre de 1 parte por billón (ppb), aunque métodos analíticos sólo pueden detectar 5 ppb. Más importante aún, las pruebas de la FDA a principios de 1990 encontraron que algunos lotes de tinte contenían hasta 83 ppb de libre y unido bencidina, con este último probablemente se libera en el tracto GI. La FDA no comprueba la bencidina límite cuando se certifica la pureza de los colorantes.

- Hipersensibilidad

La única preocupación generalmente aceptada sobre el amarillo N° 5 es sus efectos de hipersensibilidad. Se informó en la década de 1970, varios casos de sensibilidad a la tartrazina, con mayor frecuencia en la forma de urticaria (ronchas) y asma. Encontrando que el 26% de los pacientes con trastornos alérgicos tuvo una reacción alérgica positiva 10-15 minutos después de la ingestión de 50 mg del colorante. Esas reacciones incluyeron ola de calor, debilidad general, visión borrosa, aumento de las secreciones nasofaríngeas, un sentimiento de sofocación, palpitaciones, prurito (picazón severa), angioedema (hinchazón o ronchas por debajo de la piel), y urticaria.

Una asociación entre intolerancia a la aspirina y sensibilidad a la tartrazina se ha demostrado en varios estudios. Se administró por separado la aspirina y el amarillo N° 5 en 96 pacientes y encontró que cerca de la mitad de los pacientes con reacciones positivas a la aspirina también tenía reacciones positivas a Amarillo N° 5, y cerca de tres quintas partes de los casos positivos a el colorante amarillo N° 5 también tenían reacciones positivas con aspirina.

3.5.2 Amarillo N° 6 (Amarillo ocaso) (10,23)

El Amarillo N° 6 FD & C (Figura N° 2), Amarillo ocaso aprobado por la FDA, es un colorante azo sulfonado, soluble en agua que se utiliza para el color productos de panadería, cereales, bebidas, polvos de postre, dulces, postres, salchichas y otros numerosos alimentos, así como cosméticos y drogas. El Amarillo N° 6 tiene una IDA de 3,75 mg / kg de peso corporal / día, o 112,5 mg para un niño de 30 kg (FDA). Es el tercer colorante mayormente utilizado, estimando un consumo de 14 mg por persona en los productos.

El aditivo de color FD & C Amarillo N° 6 es principalmente la sal disódica del 6-hidroxi-5-[(4-sulfonil) azo]-2-naftalenosulfónico ácido (CAS Reg N° 2783-94-0.). La sal trisódica de 3-hidroxi-4-[(4-sulfonil)azo]-2,7-naftalenodisulfónico ácido (CAS Reg N° 50880-65-4) puede ser añadida en pequeñas cantidades. El aditivo de color es fabricado por diazotización de ácido 4-aminobencenosulfónico utilizando ácido y nitrito de sodio clorhídrico o ácido sulfúrico y nitrito de sodio. El compuesto diazo se acopla con ácido 6-hidroxi-2-naftaleno-sulfónico. El colorante se aisló en forma de la sal de sodio. La sal trisódica de 3-hidroxi-4-[(4-sulfonil)azo]-2,7-naftalenodisulfónico ácido que puede ser mezclado con el color principal se preparó de la misma manera, excepto el diazo ácido bencenosulfónico se acopla con 3-hidroxi ácido 2,7-naftalenodisulfónico.

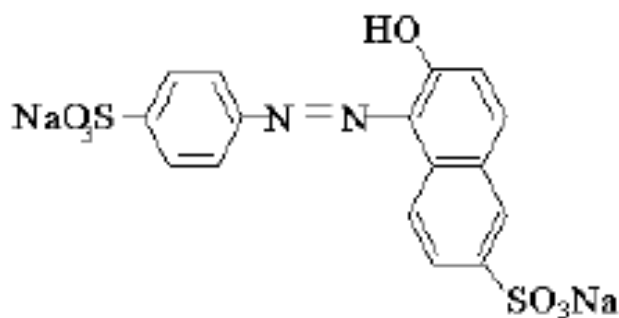


Figura N° 2. Fórmula estructural del amarillo N° 6 (amarillo ocaso) (7)

También llamado amarillo crepúsculo, ocaso o FD & C amarillo N° 6, confiere a los alimentos un color amarillo oscuro (tipo yema de huevo) o anaranjado. Pertenece al grupo de los colorantes azoicos, es del tipo monoazo, consiste principalmente de 2-hidroxí-1-(-sulfonato fenilazo)-naftaleno-6-sulfonato di sódico, junto con cloruro y/o sulfato de sodio como los principales compuestos coloreados. Se obtiene por síntesis química y se presenta en forma de polvo o gránulos de color rojo anaranjado. Es soluble en agua y glicerina e insoluble en etanol. La estabilidad de este colorante es buena, manteniendo sus características al exponerse a altas temperaturas, a la luz y a distintas condiciones de pH, se comporta bien a pH entre 3.0 y 8.0.

- Usos y restricciones.

El aditivo colorante FD & C Amarillo N° 6 se puede utilizar con seguridad para los alimentos (incluyendo los suplementos dietéticos) dando una coloración generalmente en cantidades consistentes con las buenas prácticas de fabricación actual.

- Metabolismo y efectos metabólicos

Varios metabolitos se encontraron en la orina de los conejos que recibieron una dosis oral de 0.5 mg / kg de Amarillo N° 6. Este colorante se reduce en el enlace azo principalmente en el intestino por microflora intestinal para producir ácido sulfanílico y 1-amino-2-naftol-6-sulfónico ácido, así como la forma N-acetilado de ácido sulfanílico, p-acetamidobenceno-sulfónico ácido. Se encontró alrededor del 2% de la dosis intacta de Amarillo N° 6 en las heces.

Estos resultados fueron confirmados por Honohan quien dosifica 5 ratas con 2,7 mg de ¹⁴C- Amarillo N° 6 por vía oral y se encuentra sólo 1-2% de la dosis en forma de tinte intacto en las heces después de 24 horas.

- Contaminantes cancerígenos

El amarillo N° 6 puede estar contaminado con varios agentes cancerígenos, incluyendo bencidina y 4-aminobifenilo. La FDA ha establecido un límite de 1 parte por billón (ppb) de bencidina libre.

3.6 Bebidas no carbonatadas sin alcohol ⁽²⁰⁾

Es una bebida no alcohólica que no contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto, elaborada a partir de agua potable que cumpla con la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 13.07.01:97, adicionado con azúcar y otro edulcorante permitido, saborizantes naturales o artificiales y/o de jugos o concentrado de frutas, colorantes naturales o artificiales y acidificantes, con o sin la adición de sustancias perseverantes, vitaminas y otros aditivos alimentarios permitidos y que han sido sometidos a un proceso tecnológico adecuado.

3.7 Legislación internacional y nacional sobre los colorantes.

3.7.1 Legislación Internacional ^(4,17)

Las autoridades sanitarias que marcan la pauta en normativas de uso de aditivos alimentarios, son la FDA (Food and Drug Administration) en EE.UU. y la EFSA (European Food Safety Authority) en la Unión Europea. Sin embargo, hay países que difieren respecto a las propuestas de los organismos antes mencionados.

A continuación se indican aspectos importantes de la legislación vigente para algunos países.

a) Unión Europea

Todos los aditivos, incluidos los colorantes naturales, deben contar con autorización y cumplir con el reglamento CE 1333/2008 para ser utilizados.

Adicionalmente, se les identifica con la letra E seguida de un número, que en el caso de los colorantes corresponde a los números entre 100 y 199. Son regulados respecto del tipo de alimentos al que pueden ser adicionados, en qué condiciones y las restricciones de venta de cada uno. Por ejemplo, el color rojo natural E120, corresponde a cochinilla o ácido carmínico, el que es extraído del exoesqueleto de un insecto y es usado en bebidas alcohólicas, carbonatadas, sopas y postres.

b) Estados Unidos

La FDA clasifica los colores permitidos en dos categorías:

1. Colorantes certificados: son producidos sintéticamente. Actualmente hay nueve autorizados en alimentos, los que llevan el prefijo FD&C o D&C, el color y un número. Por ejemplo: FD&C Amarillo N° 6 (Tartrazina).
2. Colorantes liberados de certificación: son los que incluyen pigmentos derivados de fuentes naturales como frutas, hortalizas, minerales o animales. Ejemplos: el extracto de annatto (amarillo), betarragas deshidratadas, caramelo, beta-caroteno y extracto de piel de uva.

c) México.

La normatividad está sustentada básicamente por la Comisión del Códex alimentarius que es un organismo internacional de la FAO y la Organización Mundial de la Salud que se basa en normas de regulación alimentaria que tienen que ver con la producción, procesamiento y comercio de alimentos para asegurar la protección de la salud de los consumidores.

Según el anexo III Colorantes con IDA establecida del acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias indican los colorantes con IDA establecidos. (Ver cuadro N° 5).

d) Argentina.

Según el Código Alimentario Argentino, los colorantes en bebidas no deben exceder las siguientes concentraciones mostradas en el cuadro N° 5

Cuadro N° 5. Límites máximos de uso colorantes en bebidas saborizadas no alcohólicas permitidas en México y en Argentina ⁽¹³⁾

Colorante	Categoría de alimento.	Límite máximo en México	Límite máximo en Argentina.	Ingesta diaria máxima recomendada	Fuente
Amarillo Ocaso o Amarillo N° 6	Bebidas saborizadas no alcohólicas	100 mg/L	100 mg/L	2.5 mg/ Kg de peso corporal	FAO/WHO, 2001.
Azul Brillante o Azul N° 1	Bebidas saborizadas no alcohólicas	100 mg/L	100 mg/L	2.5 mg / Kg de peso corporal	FAO/WHO, 2001.
Eritrosina o Rojo N° 3	Bebidas saborizadas no alcohólicas	100 mg/L	-----	10 mg/ Kg de peso corporal	FAO/WHO, 2001.
Indigotina o Azul N° 2	Bebidas saborizadas no alcohólicas	100 mg/L	-----	5.0 mg/ Kg de peso corporal	FAO/WHO, 2001.
Rojo Allura o Rojo N° 40	Bebidas saborizadas no alcohólicas	300 mg/L	100 mg/L	7.0 mg/ Kg de peso corporal	FAO/WHO, 2001.
Tartracina o Amarillo N° 5	Bebidas saborizadas no alcohólicas	100 mg/L	100 mg/L	7.5 mg/Kg de peso corporal	FAO/WHO, 2001.

3.7.2 Legislación Nacional ⁽²⁰⁾

Según el código de salud en su Art 95 menciona que el Ministerio de Salud llevará un registro de alimentos y bebidas en consecuencia se prohíbe la importación, exportación, comercio, fabricación, elaboración, almacenamiento, transporte, venta o cualquiera otra operación de suministros al público, de alimentos o bebidas empacadas o envasadas cuya inscripción en dicho registro no se hubiere efectuado. Es por ello que estos productos deberán cumplir con lo establecido según la Normativa Salvadoreñas para aditivos alimentarios, y al mismo tiempo deberán cumplir con las normas del Codex Alimentario, en donde se dicta lo siguiente sobre los colorantes.

a) Colorantes naturales.

El producto podrá ser adicionado en la cantidad adecuada para obtener el efecto deseado de los colorantes naturales indicados en el cuadro N° 6.

Cuadro N° 6. Colorantes naturales permitidos en bebidas no carbonatadas en El Salvador ⁽²⁰⁾

COLORANTES NATURALES	
<ul style="list-style-type: none"> - Annato - Alfa, beta, gamma caroteno - Alfa, beta ,gamma-8- carotenal - Beta- apo 8 carotenoide - Cacao - Cantaxantina - Caramelo - Carbon - Clorofila - Clorofila que contiene cobre 	<ul style="list-style-type: none"> - Clorofila que contiene cobre con sales de sodio y potasio - Cochinilla - Curcuma - Esteres metílico y etílico del ácido beta-apo 8 carotenoide - Remolacha - Riboflavina - Xantofila

b) Colorantes artificiales ⁽²⁰⁾

Los colorantes artificiales permitidos en el país son los siguientes y podrán ser adicionados al producto de acuerdo a las especificaciones del Cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Colorantes artificiales permitidos en bebidas no carbonatadas en El Salvador ⁽²⁰⁾

Colorante	Límites máximos, en mg/L
Azul brillante (FD& Azul N°.1)	100
Indigotina (FD & Azul N° 2)	200
Tartrazina (FD & C Amarillo N° 5)	200
Amarillo crepúsculo (FD & C amarillo N° 6)	200
Eritrosina (FD & C Rojo N° 3)	200
Rojo allura (FD & C Rojo N° 40)	200

La lista de colorantes artificiales permitidos puede ser modificada por las autoridades del Ministerio de Salud, en base a nuevos estudios toxicológicos. Los colorantes artificiales indicados no podrán emplearse en mezclas de más de tres colorantes en el producto y la suma de las cantidades agregadas no podrá exceder de 200 mg/L en el producto.

3.7.3 Información en las etiquetas ⁽²⁰⁾

Defensoría de protección al consumidor (DPC)

Es la encargada de supervisar que las normas de etiquetado se cumplan en los productos alimenticios distribuidos por los establecimientos comerciales en El Salvador. Lo relacionado con el etiquetado de alimentos se encuentra comprendido en los artículos 9 y 10 de la Ley de Protección al Consumidor. El artículo 9 refiere sobre la obligación de declarar en el empaque los ingredientes que se utilizan en su composición.

Art. 9.- Todo productor, importador o distribuidor de productos alimenticios, bebidas, medicinas que puedan incidir en la salud humana o animal, deberá imprimir en los envases o empaques de los productos que determine el Reglamento, los ingredientes que se utilizan en la composición de los mismos. Esta obligación no comprenderá la fórmula o secreto industrial utilizado en la elaboración del producto.

3.8 Implicaciones en la salud.

3.8.1 Efectos secundarios. (18,24)

En 1939 científicos japoneses constataron que un colorante sintético utilizado frecuentemente provocaba cáncer en los animales de experimentación. Este descubrimiento llevo en poco tiempo a la prohibición de todos los colorantes azoicos con fines alimentarios. Solo después de largos estudios para demostrar la inocuidad de algunos de estos colorantes, fueron permitidos nuevamente. Aun hoy dicha inocuidad toxicológica de los colorantes azoicos es discutida.

Aunque la estructura química de estos colorantes utilizados, principalmente para los dulces, ha ido cambiando con el tiempo de manera que no se descomponen en el organismo sino que son eliminados por completo e inalterados, aun traen consigo cierto riesgo.

Esto consiste básicamente en la aparición de reacciones alérgicas siendo las personas que sufren de asma o que son sensibles al ácido acetilsalicílico las que peor toleran los colores azoicos.

La tartrazina es el colorante que produce más reacciones alérgicas y es sospechoso de dejar residuos de sustancias cancerígenas, por lo tanto en Europa a partir del 20 de julio de 2010, los alimentos que contengan este colorante deben llevar la advertencia “puede alterar la actividad y la atención en niños”. Algunos alimentos que lo contienen son refrescos en polvo, dulces, helados, aperitivos, salsas, condimentos.

Mientras que el amarillo ocaso o amarillo N° 6 aparece en mermeladas, galletas y productos de pastelería, refrescos de naranja, sopas instantáneas, harinas para rebozar. Al igual que la tartrazina, se considera cancerígeno y frecuente alérgeno.

3.8.2 Colorantes en alimentos y bebidas que alteran la conducta infantil ⁽¹⁸⁾

En los años 70's cuando el pediatra Benjamin Feingold aseguró que existía una relación entre los aditivos y la manera en la que se comportaban los niños. En pacientes sensibles, la tartrazina promueve una mayor liberación de histamina, lo cual provoca reacciones en los individuos, especialmente en los niños. Referente a los impactos que tienen otros colorantes artificiales en la conducta de los niños no habían surgido estudios contundentes, sino hasta que investigadores del Reino Unido de la Universidad de Salud Infantil del Hospital General Southampton realizaron un estudio doble ciego con niños utilizando diferentes aditivos sintéticos (tartrazina, carmoisina, rojo allura, amarillo ocaso, rojo ponceau 4R y benzoato de sodio) observaron una asociación positiva a la hiperactividad y conducta de los niños.

El estudio pudo comprobar el impacto que tienen los colorantes artificiales en la conducta de los niños. La hiperactividad es un término generalmente utilizado para describir dificultades en el comportamiento que afectan el aprendizaje, la retención de información, el movimiento, el lenguaje, las respuestas emocionales y los patrones del sueño. El Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es un padecimiento crónico, y no sólo un comportamiento hiperactivo.

Con estos estudios se comprueba la clara y directa asociación que existe entre el consumo de colorantes artificiales como la tartrazina, rojo allura, amarillo ocaso, carmoisina y el benzoato de sodio como conservador y una alteración en la conducta de los niños incrementando niveles de hiperactividad y atención.

3.9 Cromatografía.

3.9.1 Definición ⁽²⁸⁾

La cromatografía se define como un procedimiento mediante el cual se separan solutos por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la que las sustancias individuales presentan diferentes movilidades a causa de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así separadas se pueden identificar o determinar mediante procedimientos analíticos.

3.9.2 Fundamento ⁽²⁹⁾

La técnica cromatográfica general requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil). La fase móvil transfiere el soluto a través del medio, hasta que éste finalmente emerge separado de otros solutos que eluyen antes o después. En general, el soluto es transportado a través del medio de separación por medio de una corriente de disolvente líquido o gaseoso denominado “eluyente”. La fase estacionaria puede actuar mediante adsorción, como en el caso de adsorbentes como la alúmina activada y el gel de sílice, o puede actuar por disolución del soluto, produciendo una partición del soluto entre la fase estacionaria y la móvil.

3.9.3 Historia ⁽²⁹⁾

En 1910, el botánico ruso M. Tswett descubrió por primera vez esta técnica, que fue aplicada a la separación de pigmentos de plantas, dándole el nombre de cromatografía en referencia a las bandas coloreadas de pigmentos que se separaban por su absorción selectiva sobre columnas de yeso. Tras su descubrimiento, la cromatografía quedó prácticamente olvidada hasta 1930 año

en que fue redescubierta por Kuhn y Lederer, quienes la aplicaron para la separación de carotenoides; a partir de este momento, el uso de esta técnica se fue extendiendo cada vez más, al tiempo que se desarrollaban diferentes versiones de la misma:

- En 1941 Marvin y Synge con la cromatografía de reparto.
- En 1944 Consden, Gordon y Marin con la cromatografía de papel
- En 1958 Stahl con la cromatografía de capa fina.

3.9.4 Adsorbentes y eluyentes ^(25,28)

En la práctica, las separaciones son frecuentemente el resultado de una combinación de efectos de absorción y de elución.

Adsorbentes:

La adsorción es el proceso por el cual un sólido atrae y retiene moléculas en su superficie. El mecanismo involucrado es físico; no existen reacciones químicas. La actividad del adsorbente se determina por su área superficial, naturaleza química y el arreglo geométrico de los átomos de su superficie. Depende de la producción de sitios activos. En función de estos sitios, los adsorbentes se clasifican en débiles, medianos y fuertes. El adsorbente no debe reaccionar con el disolvente y menos aún con los solutos a separar. Si las fuerzas físicas de unión entre el soluto y el adsorbente son muy fuertes, el soluto no se desplazará del punto de siembra, y por el contrario, si son muy débiles, correrá junto al frente de disolvente. Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar.

SILICA GEL: Su actividad se debe a los grupos silanos Si-OH.

ALÚMINA: Su actividad depende de los átomos de O_2 y de Al.

CELULOSA: Se usa sólo cuando los compuestos a separar se unen muy fuertemente a la alúmina o al silicagel (compuestos muy hidrofílicos).


La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. El adsorbente interactúa con las sustancias mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlace de hidrógeno si lo presentan.

Elución ⁽²⁹⁾

La efectividad de un solvente de desplazar al soluto del adsorbente se denomina “poder de elución”. Está asociado con la función llamada parámetro de fuerza del disolvente o coeficiente eluotrópico que es la energía de adsorción por unidad de área de un adsorbente patrón.

El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente cuadro se muestra los adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía, y el orden de elución, actividad de adsorbentes y la fuerza de elución de los disolventes.

Cuadro N° 8. Adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía. Orden de elución, actividad de adsorbentes y fuerza de elución de los disolventes. (29)

Secuencia	Orden de elución de compuestos	Actividad de adsorbentes	Fuerza de elución de disolventes
 -	Hidrocarburos saturados Hidrocarburos aromáticos Derivados halogenados Eteres	Celulosa	Eter de petróleo Ciclohexano Benceno
	Cetonas Aldehidos Esteres Alcoholes Aminas Acidos	Sulfato cálcico (Yeso) Silice Florisil Oxido de magnesio Alumina Carbon activo	Tetracloruro de carbono Diclorometano Cloroformo Eter dietilico Acetato de etilo
+			Acetona n-propanol Etanol Metanol Agua Ácido acético

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada. El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error".

3.9.5 Determinación del Rf ⁽²⁵⁾

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de:

- La polaridad del compuesto.

Determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.

- Naturaleza del disolvente.

Un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa. La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como Rf, y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

Para calcular el Rf se aplica la siguiente expresión:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo del Rf. Se

recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f medio en torno a 0.3-0.5 como se muestra en la figura N° 3. Para valores de R_f menores que 0.3 la mancha estará muy concentrada y para valores mayores de 0.7 muy difusa. Para compuestos poco polares, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano /metanol en distintas proporciones.

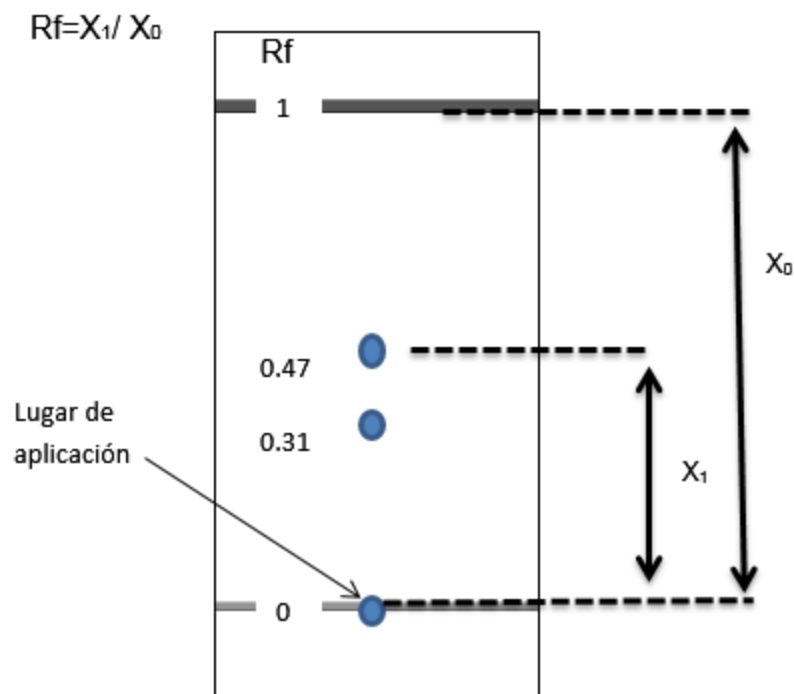


Figura N° 3. Aspecto clásico de una placa cromatografía en capa fina (CCF) después del revelado de las manchas de migración (29)

3.9.6 Estándares de Referencia. (16)

Mediante la aplicación sobre el adsorbente en capa delgada o el papel, de soluciones de la sustancia que se desea identificar, la muestra auténtica y una mezcla de cantidades prácticamente iguales de la sustancia que se desea identificar en una línea recta, paralela al borde de la placa cromatográfica como se muestra en la figura N° 4.

Cada aplicación de muestra contiene aproximadamente la misma cantidad, en peso, del material a cromatografiar. Si la sustancia que se quiere identificar y la muestra auténtica son idénticas, entonces todos los cromatogramas concuerdan en color y en valor Rf.

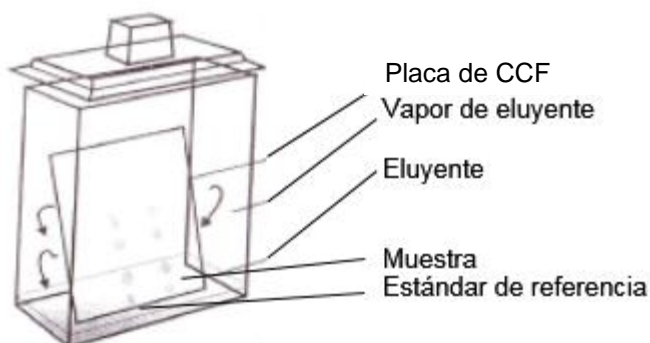


Figura N° 4. Cámara de desarrollo con cubeta vertical y placa de CCF.

3.9.7 Ubicación de los Componentes. (16)

Las manchas producidas mediante la cromatografía en capa delgada o en papel se pueden ubicar de las siguientes maneras:

- Por inspección directa, si los compuestos son visibles bajo luz blanca o luz UV de longitud de onda corta (254 nm) o larga (360 nm)

- Por inspección bajo luz blanca o luz UV después del tratamiento con reactivos que hacen que las manchas sean visibles (los reactivos se aplican de manera más conveniente con un atomizador)
- Mediante el uso de un contador Geiger-Muller o técnicas de autorradiografía en el caso de la presencia de sustancias radioactivas.

3.9.8 Cromatografía en capa fina (CCF). ⁽¹⁶⁾

En la cromatografía en capa fina, el adsorbente es una capa relativamente delgada y uniforme de material seco, reducido a polvo fino, que se aplica sobre una lámina o placa de vidrio, plástico o metal; las que se utilizan más comúnmente son las placas de vidrio.

La placa recubierta puede considerarse una “columna cromatografía abierta” y las separaciones logradas pueden basarse en la adsorción, la partición o una combinación de ambos efectos, según el tipo específico de fase estacionaria, su preparación y los disolventes empleados.

La cromatografía en capa delgada de capas de intercambio iónico puede emplearse para separar compuestos polares. La identificación presuntiva se puede efectuar mediante la observación de las manchas o zonas con valores RF idénticos y de magnitud aproximadamente igual, obtenidos respectivamente una muestra desconocida y una muestra de referencia en la misma placa.

Una comparación visual del tamaño o intensidad de las manchas o zonas puede servir para una estimación semicuantitativa. Las mediciones cuantitativas se pueden efectuar mediante densitometría (mediciones de absorbancia o de fluorescencia) o bien pueden retirarse cuidadosamente las manchas de la placa, luego eluirse con un disolvente adecuado y medirse espectrofotométricamente.

3.9.9 Equipo y material necesario para cromatografía en capa fina ⁽¹⁶⁾

El equipo y los materiales aceptables para la cromatografía en capa fina comprenden lo siguiente:

- Una placa para cromatografía en capa fina (CCF). Por lo general se utilizan hojas o placas previamente recubiertas con silica gel (en soporte de vidrio, aluminio o poliéster) de tamaño adecuado. En el momento de uso, las placas se pueden activar, si fuera necesario, calentándolas en una estufa a 110°C a 120°C por 20 minutos para eliminar el agua que pueda estar retenida en el sólido. Este paso se conoce como 'activación' y habilita la capa para una separación líquido - sólido.
- Un dispositivo de aplicación manual, semiautomático o automático (ver figura N° 5) adecuado para asegurar una colocación correcta de la placa y una apropiada transferencia de la muestra, con respecto al volumen y a la posición, a la placa. Para la correcta aplicación de las soluciones, se recomiendan micro pipetas, micro jeringas o capilares calibrados desechables
- Una cámara cromatográfica de un material inerte transparente para el desarrollo ascendente y con las siguientes especificaciones: una cubeta de fondo plano o cubetas gemelas, con una tapa que cierre herméticamente y de un tamaño adecuado para las placas. Para el desarrollo horizontal, la cámara está provista de un recipiente para la fase móvil y también contiene un dispositivo para dirigir la fase móvil hacia la fase estacionaria.
- Dispositivos para transferencia de reactivos a la placa mediante rociado, inmersión o exposición a vapor y dispositivos para facilitar el calentamiento necesario para la visualización de las zonas o manchas separadas.

- Una fuente de luz UV adecuada para realizar observaciones bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm).
- Un dispositivo para documentar adecuadamente el resultado cromatográfico visualizado.

3.9.10 Cuantificación en cromatografía de capa fina (CCF). ⁽¹⁶⁾

Se puede determinar directamente en la placa las sustancias separadas por TLC que responden a la radiación ultravioleta o visible (UV-Vis). Mientras se mueve la placa o el dispositivo de medición (Ver figura N° 5), la placa se examina midiendo la reflectancia de la luz incidente. Las sustancias que contienen radio nucleídos se pueden cuantificar de tres formas:

- Directamente moviendo la placa a lo largo de un contador adecuado o viceversa (ver figura N° 5)
- Cortando las placas en tiras y midiendo la radioactividad en cada tira individual, utilizando un contador adecuado.
- Raspando la fase estacionaria, disolviéndola en un cóctel de centelleo (disolvente) adecuado y midiendo la absorbancia o fluorescencia en un equipo.

Para pruebas cuantitativas, es necesario aplicar a la placa no menos de tres soluciones estándar de la sustancia a examinar, cuyas concentraciones cubran el intervalo de valores esperado en la solución de prueba (por ejemplo, 80%, 100% y 120%). Realizar la derivatización con el reactivo indicado, si fuera necesario, y registrar la reflectancia o fluorescencia en los cromatogramas obtenidos. Utilizar los resultados determinados para el cálculo de la cantidad de sustancia presente en la solución de prueba.

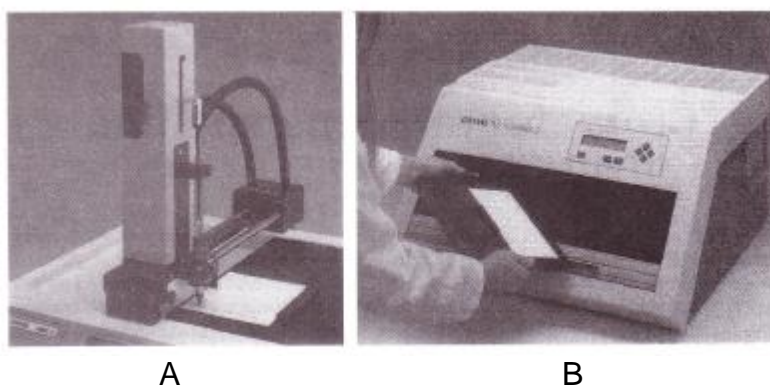


Figura N° 5. Aparato de aplicación automático en CCF (A) y densitómetro lector de placa Scanner-3 (B)

3.10 Espectroscopia UV-Vis. (14,16)

3.10.1 Espectrofotometría de Absorción. (16)

La espectrofotometría de absorción es la medición de una interacción entre una radiación electromagnética y las moléculas o átomos de una sustancia química. La medición espectrofotométrica en la región visible anteriormente se denominaba colorimetría; sin embargo, es más preciso emplear el término “colorimetría” sólo en aquellos casos en que se considera la percepción humana del color.

El intervalo de longitud de onda disponible para estas mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta del UV hasta el IR. Por conveniencia, este intervalo espectral está aproximadamente dividido en el UV (190 a 380 cm^{-1}), el visible (380 a 780 cm^{-1}), el IR cercano (780 a 3000 cm^{-1}) y el IR (4000 cm^{-1} a 250 cm^{-1}) como se observa en la figura N° 6.

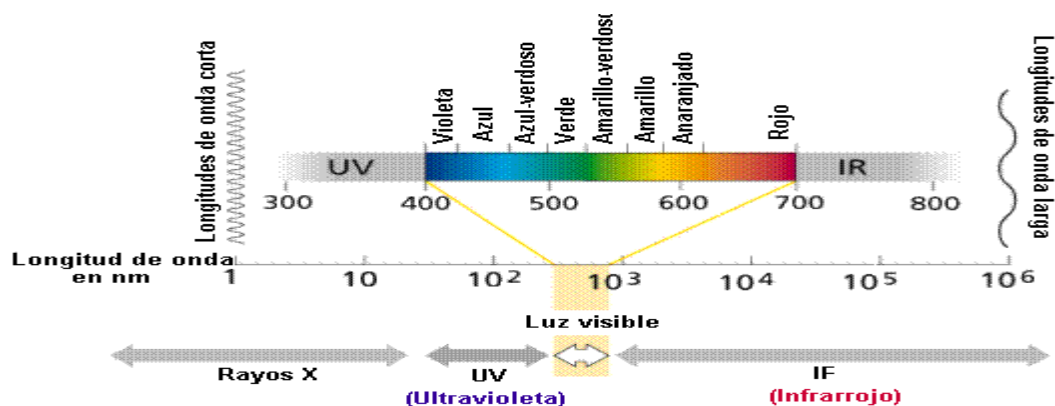


Figura N° 6. Intervalo de longitud de onda del espectro Visible (29)

3.10.2 Utilidad comparativa de intervalos espectrales. (15)

En el caso de muchas sustancias, las mediciones pueden hacerse con mayor exactitud y sensibilidad en las regiones del UV y visible del espectro que en las del IR cercano e IR. Cuando se observan soluciones en celdas de 1 cm, las concentraciones de aproximadamente 10 mg de muestra por mL a menudo producen absorbancias entre 0.2 y 0.8 en el UV o la región de luz visible.

En el IR e IR cercano, pueden ser necesarias concentraciones de 1 a 10 mg por mL y de hasta 100 mg por mL, respectivamente, para que se produzca una absorción suficiente; para estos intervalos espectrales, se utilizan celdas con longitudes de 0,01 mm a más de 3 mm. Por lo general, los espectros UV y visible de las sustancias no tienen un alto grado de especificidad. Sin embargo, son muy apropiados para realizar valoraciones cuantitativas y, en el caso de muchas sustancias, son útiles como medios adicionales de identificación (ver figura N° 7).

La región del IR cercano es especialmente apropiada para la determinación de grupos $-OH$ y $-NH$, como por ejemplo agua en alcohol, $-OH$ en presencia de aminas, alcoholes en hidrocarburos y aminas primarias y secundarias en presencia de aminas terciarias. El espectro IR es único para cualquier

compuesto químico dado, con la excepción de los isómeros ópticos que tienen espectros idénticos.

Los espectrómetros UV-Vis permiten obtener el espectro de compuestos a modo de curva que representa la transmitancia o la absorbancia en función de las longitudes de onda (ver figura N° 7), expresada en nanómetros.

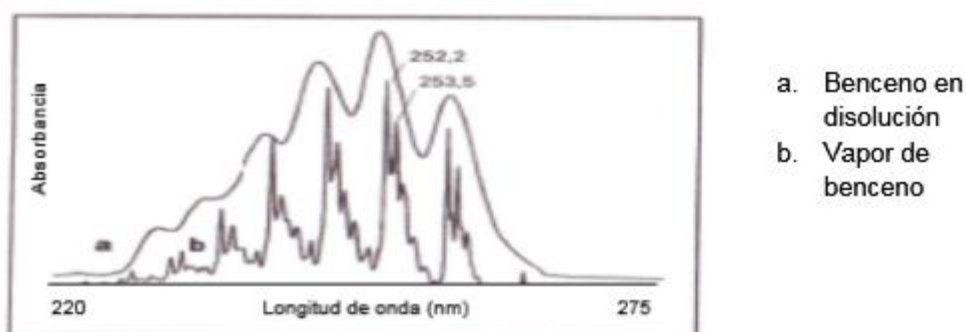


Figura N° 7. Aspectos distintos de espectros registrados en la región UV- Vis. Espectros del benceno (a) en disolución (espectro en bandas); (b) en estado de vapor (espectro que presenta un estructura final)

3.10.3 Teoría espectro UV-VIS.⁽¹⁶⁾

La potencia de un haz de luz radiante disminuye en relación con la distancia que recorre en un medio de absorción. También disminuye en relación a la concentración de moléculas o iones absorbentes con los que se encuentra en ese medio.

Estos dos factores determinan la proporción de la energía incidente total que emerge. La disminución de la potencia de una radiación monocromática que atraviesa un medio de absorción homogéneo se determina cuantitativamente mediante la ley de Beer.

3.10.4 Grupos Cromóforos. ⁽¹⁴⁾

Los grupos funcionales de compuestos orgánicos (cetonas, aminas, derivados nitrados, etc.) responsables de la absorción en la región UV-Vis se denominan grupos cromóforos (ver Cuadro N° 8). Una especie constituida por un esqueleto carbonado transparente portador de uno o varios cromóforos es un cromógeno.

Cuadro N° 9. Cromóforos característicos de algunos grupos funcionales nitrogenados ⁽¹⁴⁾

Nombre	Cromóforo	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\epsilon_{\text{max}}(\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
Amina	-NH ₂	195	3000
Oxima	-NOH	190	5000
Nitro	-NO ₂	210	3000
Nitrito	-ONO	230	1500
Nitrato	-ONO ₂	270	12
Nitroso	-N=O	300	100

3.10.5 Instrumentación para espectrometría UV-Vis. ⁽¹⁴⁾

Generalmente un espectrómetro está constituido por tres partes diferenciadas: la fuente, el sistema dispersivo (frecuentemente un monocromador) y el detector (ver figura N° 8). Estas tres partes pueden presentarse separadamente pero en los instrumentos para análisis químico normalmente esta integradas en un mismo armazón.

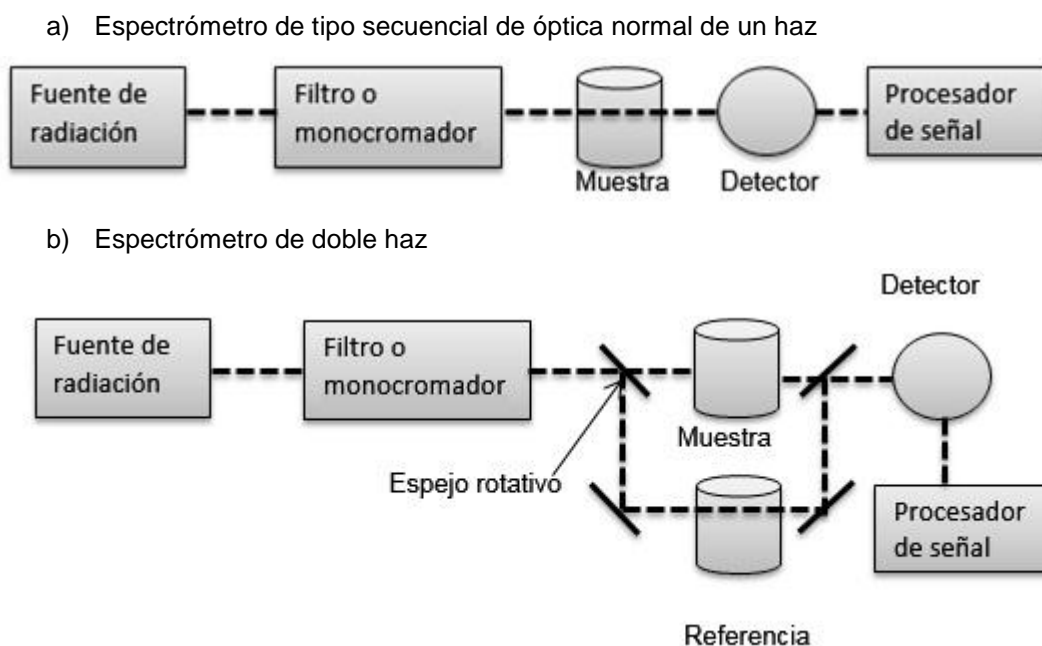


Figura N° 8. Instrumentación para espectrofotometría UV-Vis. Dos modalidades de instrumentos que originan un espectro mediante dos procedimientos diferentes: a) un haz, b) doble haz

3.10.6 Fuentes luminosas. ⁽¹⁴⁾

Cualquier espectrofotómetro necesita de una fuente luminosa. Los tipos de lámparas utilizadas son:

- Lámpara incandescente con filamento de wolframio y cubierta con vidrio de sílice en la parte visible del espectro.
- Lámpara de arco de deuterio de presión media, para la región UV (< 350 nm).
- Lámpara de arco de xenón, que abarca todo el rango comprendido entre 200 y 1100nm, utilizada en los instrumentos de rutina.

3.11 Análisis cuantitativo: Leyes de la absorción molecular.

3.11.1 Ley de Lambert-Beer. ⁽¹⁴⁾

La región ultravioleta-visible se ha utilizado ampliamente en análisis cuantitativo y desde hace mucho más tiempo la región visible. Las medidas se basan en la ley de Lambert-Beer que relaciona, en determinadas condiciones, la absorción de la radiación con la concentración de un compuesto en disolución.

El origen de esta ley se remonta a los trabajos del matemático francés Lambert que estableció en el siglo XVIII, las bases de la fotometría. Igualmente Beer, físico alemán del siglo XIX, estableció una ley que permite calcular la cantidad de radiación transmitida por un compuesto en disolución en una matriz no absorbente, después de un paso a través de determinado espesor.

Así resulta la ley de Lambert-Beer presentada a continuación en su forma actual:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

En donde:

A: Representa la absorbancia- parámetro óptico adimensional registrado por el espectrofotómetro.

l: Espesor (en cm) de la disolución atravesada.

c: Concentración molar.

ϵ : Coeficiente de absortividad molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) a la longitud de onda (λ) a la cual se realiza la medida.

Esta ley se cumple en las siguientes condiciones:

- La luz utilizada debe ser monocromática.
- Las concentraciones deben ser bajas.
- La disolución no debe ser fluorescente ni heterogénea.
- El soluto no debe sufrir transformaciones fotoquímicas.
- El soluto no debe originar asociaciones variables con el disolvente

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

- Experimental

Se efectuó la determinación cualitativa de los colorantes artificiales N°5 y N° 6 FD&C por medio de cromatografía de capa fina y la cuantificación de los mismo por espectroscopia UV- Vis.

- Transversal

Esta investigación se realizó en un tiempo determinado para conocer la problemática en dicho momento.

- Prospectivo

De esta investigación, los resultados pueden retomarse para estudios en un futuro.

4.2 Investigación bibliográfica

En esta parte se llevó a cabo la revisión de diferentes libros en distintas bibliotecas dentro y fuera de la Universidad de El Salvador y de páginas electrónicas de internet con contenidos relacionados al tema de investigación.

Dicha investigación se realizó en las siguientes bibliotecas.

- Dr. Benjamín Orozco Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de El Salvador.
- Padre Florentino Idoate, S.J, de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdoba” (CENTA).
- Internet.

4.3 Investigación de campo.

Esta se realizó en las ventas ubicadas alrededor de los accesos (ver anexo N° 1) del Campus Central de la Universidad de El Salvador, mediante una lista de chequeo se sondearon las marcas, precios, sabores y presentaciones de las bebidas no carbonatadas comercializadas en cada uno de los puestos de venta, que declaren en su contenido los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD & C (ver anexo N° 2), luego se realizó una encuesta piloto para conocer el nivel de consumo de la población en estudio.

Posteriormente, se realizaron las encuestas (ver anexo N° 3) determinadas estadísticamente, dirigidas a la población general (personal docente, administrativo y estudiantes) de la Facultad de Química y Farmacia de la misma universidad con el propósito de conocer las marcas comerciales preferidas por la población en estudio y de esta manera definir las tres marcas a muestrear para realizar la investigación experimental. El número de encuestas a realizar para que la muestra sea representativa de toda la población en estudio se determinó usando la siguiente fórmula estadística (3).

$$n = \frac{Z^2 \cdot P \cdot Q \cdot N}{(N - 1)E^2 + Z^2 \cdot P \cdot Q}$$

Dónde:

n = el tamaño de la muestra

N = tamaño de la población.

P = Proporción poblacional de un determinado evento (éxito).

Q = Proporción poblacional de que no ocurra ese evento = $1 - P$.

Z = Valor obtenido mediante niveles de confianza.

E = Límite aceptable de error muestral.

Los resultados obtenidos de la encuesta (ver anexo N° 4) se utilizaron para seleccionar las tres marcas de bebidas no carbonatadas que declaran en su etiqueta amarillo N° 5 y N° 6 FD&C, que son mayormente consumidos por la población en estudio.

Universo.

Todas las marcas de bebidas no carbonatadas comercializadas en los accesos (entradas y salidas) al campus Central de la Universidad de El Salvador que en su etiqueta declaren los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C (ver anexo N° 2).

Muestra.

Las tres marcas de bebidas no carbonatadas preferidas por el personal docente, administrativo y estudiantil de la Facultad de Química y Farmacia del Campus Central de la Universidad de El Salvador (ver anexo N° 3), de las cuales se eligió, aleatoriamente, un sabor de cada marca comercial y se adquirieron seis envases de cada presentación para hacer un pool, posteriormente se realizaron tres extracciones de los colorantes de cada pool de bebida, realizándose tres réplicas de cada extracción.

4.4 Parte Experimental.

4.4.1 Determinación cualitativa de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C por Cromatografía en Capa Fina (CCF) ^(9,10)

A. Material, equipo y reactivos. (Ver anexo N° 5)

B. Fundamento del método. ^(2, 5, 9, 11, 12, 26)

La lana desengrasada se utiliza como proteína, ya que es un agente fijador adecuado, es insoluble y su carga puede manipularse cambiando el pH. A un pH bajo, los grupos carboxilo y amino de la proteína de la lana se protonarán

dándole una carga neta positiva. Las moléculas colorantes permanecen cargadas negativamente a bajo pH porque son sales de un ácido fuerte. El ácido acético, un ácido débil, se utiliza para acidificar el alimento, de manera que cuando se agregue la lana, esta se protonará cuando las moléculas del colorante se unen a la lana en estas condiciones, al enjuagar en agua fría, el color no se elimina debido a la interacción fuerte entre el colorante y la lana. Al hervir suavemente la fibra de lana en álcalis diluido se desprotonan los grupos amino de la proteína de la lana. Esto rompe las fuerzas electrostáticas de los enlaces y el color se libera pasando de la hebra de lana a la solución.

C. Procedimiento para desengrasado de lana cruda de oveja ^(11,12)

- Colocar la lana blanca cruda en una cámara de extracción continua (Soxhlet).
- Medir 200 mL de éter de petróleo.
- Colocar el éter en el balón de fondo redondo.
- Armar el aparato completo y refluja por 3 horas para retirar la grasa.
- Retirar la lana (evitar tocar con los dedos) y colocarla sobre un vidrio de reloj.
- Dejar a temperatura ambiente en una cámara extractora de gases para volatilizar el éter.
- Sumergir la lana desengrasada en una solución de Hidróxido de Amonio al 5% por 1 hora.
- Secar completamente en un horno a 65-70 °C.
- Colocar la lana en un desecador con silica gel activa hasta el momento de su uso.

- D. Extracción y determinación de amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en bebidas no carbonatadas (2,3,9,11,12,26).
- i. Preparación de la muestra.
 - Mezclar el contenido de los seis envases de la marca de bebida no carbonatada seleccionada, en un solo contenedor.
 - Medir 100.0 mL de muestra de bebida no carbonatada y transferir a un beaker de 150 mL.
 - Acidificar ligeramente con ácido acético glacial hasta obtener un pH entre 2.5-3.0, medido con papel pH.
 - Rotular esta solución como A.
 - Realizar dos extracciones más y rotular como B y C.
 - ii. Extracción de los colorantes. (2,5,9,10,12)
 - Agregar 20 cm de lana desengrasada a las muestras acidificadas.
 - Hervir la solución durante 5 minutos y luego dejarla en contacto a temperatura ambiente por 15 minutos.
 - Retirar la lana de la solución y lavarla con agua destilada fría.
 - Transferir la lana coloreada a un beaker de 50 mL que contenga 10 mL de amoníaco 0.5 N y dejar en contacto hasta que el colorante depositado en la lana pase a la solución amoniacal.
 - Retirar la lana del Beaker que contiene la solución amoniacal y colocarla nuevamente en la solución acidificada anterior.
 - Repetir el mismo procedimiento en los mismos 10 mL de solución amoniacal hasta que la muestra quede incolora.
 - Retirar la lana del Beaker con el colorante en la solución amoniacal y concentrar la solución hasta un volumen aproximado de 1 mL, de ser necesario agregar agua a la muestra para evitar llegar a sequedad.
 - Enfriar y transferir la solución concentrada a un balón volumétrico de 10.0 mL y aforar con agua destilada.

- iii. Identificación de los colorantes por el método de Cromatografía en Capa Fina (CCF) (ver anexo N°7) ^(2,5,9,11,12,26)
- Proceder a la activación de la placa cromatográfica 20x20 cm calentándola en una estufa a 110 °C - 120°C por 20 minutos.
 - Preparar el eluyente compuesta por Isopropanol e hidróxido de Amonio concentrado (4:1 v/v).
 - Colocar la fase móvil en un tanque para cromatografía y tapar el tanque hasta saturar la cámara.
 - Sacar la placa cromatográfica de la estufa y dejarla enfriar a temperatura ambiente.
 - Preparar estándares de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C con las siguientes concentraciones 0.25, 0.50, 1.0, 1.25, 1.50 mg/mL. (ver anexo N° 5).
 - Marcar sobre la placa cromatografía marcar una línea de 2 cm del borde inferior, y sobre esta línea marcar puntos equidistantes, dejando una distancia de 1 cm de cada borde lateral.
 - Aplicar con una jeringa de tuberculina, 0.1mL de las soluciones estándares de las diferentes concentraciones de los colorantes, secar las manchas con secadora de cabello.
 - De igual forma aplicar 0.1mL de las muestras a analizar de la repetición A, B, C e igualmente secar las manchas con secadora.
 - Colocar la placa cromatográfica en el tanque cromatográfico, desarrollar el cronograma hasta que el frente del solvente haya recorrido $\frac{3}{4}$ desde el borde inferior de la placa.
 - Retirar la placa cromatográfica de la cámara cromatográfica y marcar el frente del solvente.
 - Medir el desplazamiento de las muestras y de los estándares.

- Documentar los resultados obtenidos del desplazamiento de cada una de las muestras y estándares sobre la placa CCF (ver anexo N° 6)
- Utilizar la siguiente fórmula para determinar el coeficiente de reparto Rf y así identificar los colorantes (Los Rf teóricos para el amarillo N°5 son de 0.36-0.39 y el Rf para el amarillo N°6 es de 0.47-0.48)

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

iv. Cuantificación de los colorantes por el método de espectrofotometría UV-Visible (Ver anexo N° 8). (2, 5, 9, 11, 12, 26).

- Cortar las manchas de cada una de las muestras y estándares aplicados en la placa.
- Colocar en tubos de ensayo individuales y rotular.
- Agregar 5.0 mL de agua destilada a cada uno de los tubos.
- Transferir la solución a una celda espectrofotométrica y realizar las lecturas para el amarillo N° 5 FD&C a una longitud de onda de 427 nm y para el amarillo N° 6 FD&C a una longitud de onda de 482 nm.
- Leer un blanco compuesto de una porción cortada de la placa cromatográfica.
- Elaborar una curva de calibración con las lecturas obtenidas de los estándares aplicados (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.50 mg/mL) para amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.
- Realizar las lecturas de las diferentes muestras
- Calcular la concentración de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en las muestras analizadas utilizando la fórmula de Lambert Beer:

$$C_{\text{muestra}} = \frac{C_{\text{estándar}} * A_{\text{muestra}}}{A_{\text{estándar}}} * FD$$

Donde:

C muestra= concentración de la muestra.

C estándar= concentración del estándar.

A muestra= absorbancia de la muestra.

A estándar= absorbancia del estándar.

FD = Factor de dilución de la muestra (ver anexo N° 5)

4.5 Estructuración de la socialización de los resultados.

Se impartió una charla en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador para socializar los resultados obtenidos de esta investigación. La cual tuvo una duración aproximada de 40 minutos en donde se dio a conocer los posibles efectos a la salud que conlleva el consumo de alimentos que contengan los colorantes artificiales estudiados.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

5.1 Selección de las marcas de bebidas.

Con la lista de chequeo que se utilizó (ver anexo N° 2) para conocer los puntos de acceso (entradas y salidas) y obtener las marcas, precios, sabores y presentaciones de las diferentes bebidas no carbonatadas que declaran en su etiqueta los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C comercializadas en ellos, se muestran en el cuadro N°10.

Cuadro N° 10. Puntos de accesos al Campus Central de la Universidad de El Salvador y puestos de venta en cada uno de ellos.

Punto de acceso N°	Localización	N° de puestos	Marcas comercializadas
1	Entrada y salida peatonal principal (Minerva)	7	Jugos Frutado Jugos del Valle
2	Entrada y salida peatonal y vehicular Facultad de Economía.	6	Jugos Frutado Jugos del Valle
3	Entrada y salida peatonal y vehicular Facultad de Ciencias y Humanidades.	3	Jugos del Valle
4	Entrada y salida peatonal y vehicular Polideportivo	3	Super juoó Jugos Frutado Jugos del Valle
5	Entrada y salida peatonal y vehicular Facultad de Ingeniería y Arquitectura.	0	N/A
6	Entrada y salida peatonal y vehicular Facultad de Química y Farmacia.	0	N/A
7	Entrada y salida peatonal y vehicular Facultad de Odontología	6	Super juoó Jugos Frutado Jugos del Valle

Nota: N/A significa que no se comercializa ninguna marca en la zona

Como se observa en el cuadro N° 10, el Campus Central de la Universidad de El Salvador cuenta con siete diferentes accesos, de los cuales en cinco existen puestos de ventas donde se comercializan cuatro diferentes marcas de bebidas

no carbonatadas que declaran en su etiqueta amarillo N° 5 y amarillo N° 6 siendo estas:

- Jugos del Valle
- Jugos frutado
- Súper Juoó
- Jugos La Cascada.

Con la lista de chequeo también se verificaron las presentaciones, sabores y precios que tienen estas bebidas no carbonatadas. (Ver cuadro N° 11).

Cuadro N° 11 Presentaciones, sabores y precios de las marcas de bebidas no carbonatadas que declaran amarillo N° 5 y N° 6 FD&C comercializadas en los accesos al Campus de la Universidad de El Salvador.

Marca de jugo	Sabor	Presentación en envase plástico (mL)	Precio (\$)
Del Valle	Mandarina, Naranja y Limón	500	0.50
Frutado	Durazno	500	0.50
Súper Juoó	Mandarina y Naranja	600	0.50
La Cascada	Naranja	300	0.35

5.2 Resultados de encuesta dirigida a la población de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador

Con el objetivo de conocer las preferencias en cuanto al consumo de bebidas no carbonatadas y con la información recolectada mediante la lista de chequeo se procedió a realizar una encuesta piloto con 20 participantes (ver anexo N° 4), las cuales fueron incluidas en el número total de encuestas a realizar.

Al consultar en la encuesta piloto si se consume alguna bebida envasada no carbonatada con sabor artificial, 18 personas que corresponden a un 90% de los encuestados respondieron que sí (ver anexo N° 4), con estos resultados se procedió a definir el número total de encuestas a realizar por sector para que la información recopilada sea representativa de toda la población en estudio.

Así tomando como criterio los siguientes valores:

Z= 1.96 a un nivel de confianza a un 95%

E= error muestral del 5%

P= Éxito del consumo de bebidas del 90% de la población

Q= Probabilidad de que la población no consuma estas bebidas 10%

N= 812 tamaño total de la población en estudio (83 docentes, 54 administrativos y 675 estudiantes).

$$n = \frac{Z^2 \cdot P \cdot Q \cdot N}{(N - 1)E^2 + Z^2 \cdot P \cdot Q}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 * (0.90) * (0.10) * (812)}{(812 - 1)(0.05)^2 + (1.96)^2 * (0.90) * (0.10)}$$

$$n = 118.295 \text{ encuestas a realizar}$$

Se realizaron, por lo tanto, 119 encuestas.

Para conocer el número de encuestas que se harían por sector se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Cantidad de encuestas} = n_E (n_i/n_T) \quad (3)$$

Dónde:

n_E = número de encuestas a realizar

n_i = número de personas por sector (docentes, estudiantes y administrativos)

n_T = total de personas.

Obteniéndose los resultados siguientes:

- Cantidad de encuestas a realizar a estudiantes:
Encuestas a los estudiantes = $119 * \left(\frac{675}{812}\right) = 99$
- Cantidad de encuestas a realizar a los docentes
Encuestas a docentes = $119 * \left(\frac{83}{812}\right) = 12$
- Cantidad de encuestas a realizar a los administrativos
Encuestas a administrativos = $119 * \left(\frac{54}{812}\right) = 8$

La población de cada sector que se encuestó fue seleccionada aleatoriamente.

5.3 Resultados de la encuesta.

Los resultados obtenidos de la encuesta se muestran a continuación:

a) Consumo

De un total de 119 personas encuestadas (personal docente, administrativo y estudiantil), 102 consumen bebidas no carbonatadas que contienen los colorantes amarillo N° 5 y N° 6, mientras que 17 de estas no las consumen (ver anexo N° 4)

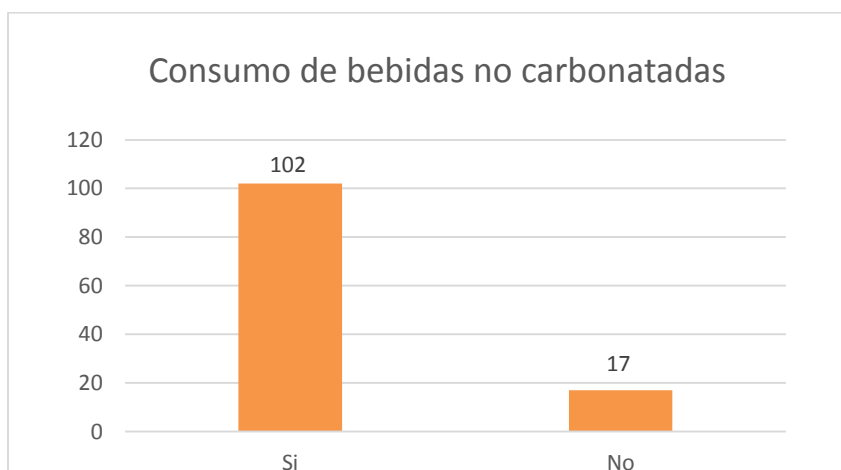


Figura N°9. Grafica de la cantidad de encuestados que consumen bebidas no carbonatadas con sabor artificial que rotulan los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.

Las razones por las que los encuestados no consumen estas bebidas se muestran en el cuadro N° 12.

Cuadro N° 12. Razones por que la que algunas personas no consumen este tipo de bebidas no carbonatadas.

Población	No me gustan	Me causa alergia
Estudiantes	10	0
Docentes	3	1
Administrativos	2	1

b) Marcas preferidas.

La respuesta a esta pregunta se utilizó para definir las tres marcas de bebidas que se analizaron en el laboratorio.

Cuadro N°13. Marcas de bebidas no carbonatadas más consumidas por los encuestados.

Población	Marcas de bebidas no carbonatadas				Total
	Del valle	Súper Juoó	Frutados	La Cascada	
Docentes	5	0	3	0	8
Estudiantes	53	13	16	7	89
Administrativos	1	2	1	1	5
Total	59	15	20	8	102*

* Nota: De los 119 encuestados, 17 no consumen estas bebidas.

Basados en los resultados obtenidos de esta parte de la encuesta, se obtuvieron las tres marcas comerciales de estas bebidas que son preferidas por la población encuestada, las cuales son: Del Valle, Super Juoó, y Frutado. Por lo tanto los análisis se realizaron en estas bebidas por triplicado. (ver figura N° 10)

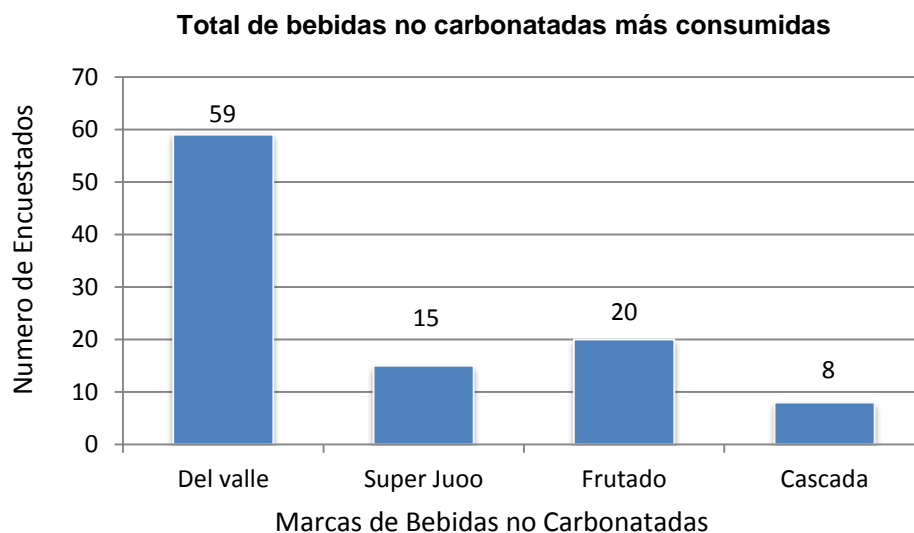


Figura N° 10 Gráfica de las marcas de bebidas no carbonatadas que son consumidas con mayor frecuencia por la población encuestada.

c) Cantidad y frecuencia de consumo.

La cantidad y frecuencia de consumo de estas bebidas por parte de la población en estudio (estudiantes, docentes y administrativos de la Facultad de Química y Farmacia) se muestran en los cuadros N° 14 y N° 15 FD & C.

Cuadro N° 14. Consumo de bebidas no carbonatadas por presentación.

Consumo de bebidas por presentación	Presentación			
	Menos de un litro	Un litro	Más de un litro	Total
Estudiantes	82	4	3	89
Docentes	8	0	0	8
Administrativos	5	0	0	5
Total	95	4	3	102

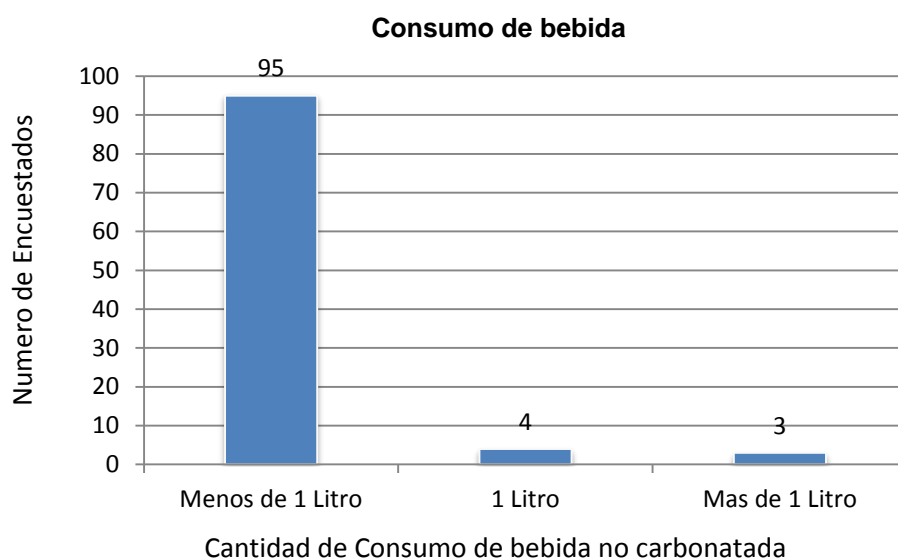


Figura N°11. Gráfica de la cantidad de bebidas no carbonatadas consumidas por la población encuestada.

Cuadro N° 15. Frecuencia de consumo de bebidas no carbonatas por la población encuestada.

Frecuencia de consumo	Diariamente	Una vez a la semana	Tres veces a la semana	Total
Estudiantes	7	62	20	89
Docentes	0	8	0	8
Administrativos	0	4	1	5
Total	7	74	21	102

La mayoría de la población encuestada (95 personas) consume menos de 1L de estas bebidas, mientras que 4 personas consumen 1L, y solamente 3 personas consume más de 1L. En cuanto a la frecuencia de consumo 74 de los encuestados, toma este tipo de bebida una vez a la semana, 7 personas lo consumen diariamente y 21 lo consumen tres veces a la semana. Lo anterior podría ser un indicio que la población está “consiente” que el consumo excesivo de este y otros productos que contienen colorantes artificiales pueden causar problemas de salud a futuro.

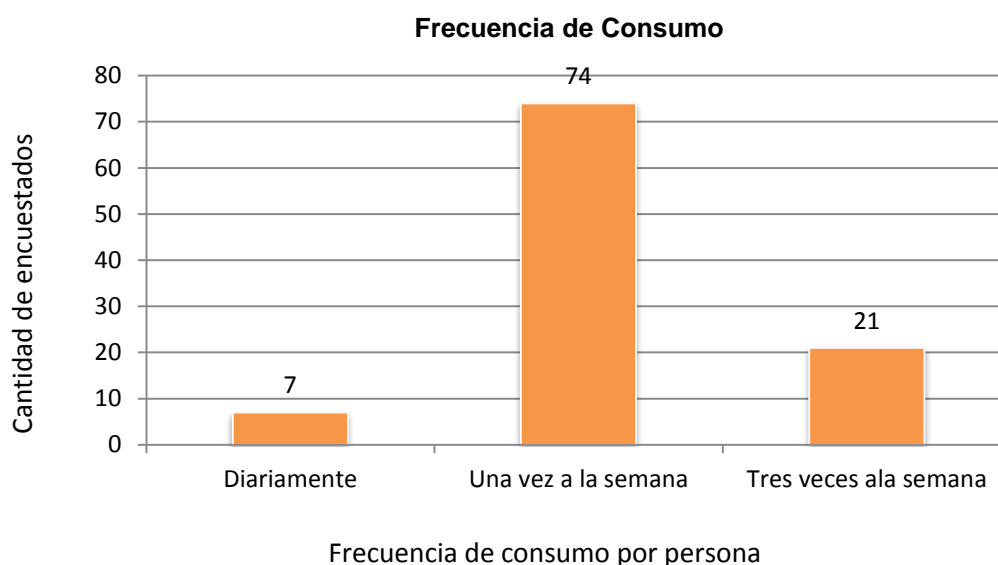


Figura N°12. Gráfica de la frecuencia de consumo de bebidas no carbonatadas por los encuestados.

d) Razones del consumo.

Al consultar, a la población sobre las características que lo hacen elegir estas bebidas para su consumo, 87 personas manifestaron que era por su sabor, 74 por el precio, 12 por el color, 9 por salud, y por preferencia a la marca comercial 10 personas respectivamente, lo cual indica que las personas no son influenciadas por los aspectos estéticos como el color, ya que las prefieren por su sabor y precio, y no por su color.

Cuadro N° 16. Características por las que la población consume estas bebidas.

Población	Color	Sabor	Precio	Salud	Marca comercial
Estudiantes	11	78	62	5	10
Docentes	0	6	8	4	0
Administrativos	2	3	4	0	0
Total	12	87	74	9	10

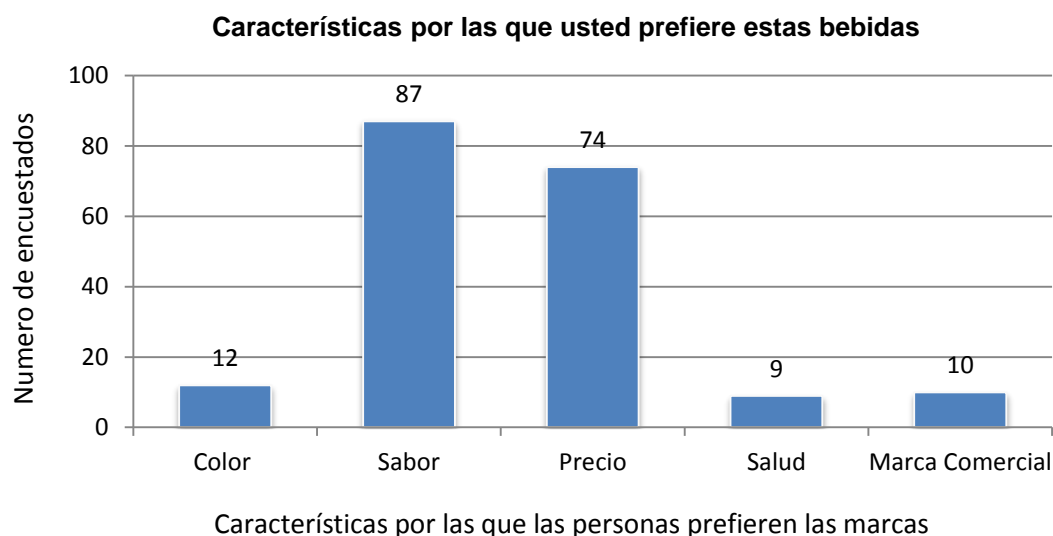


Figura N°13 Gráfico de las características por las que la población consume este tipo bebidas.

e) Problemas de salud.

Al consultar sobre el conocimiento de los efectos a la salud que implica el consumo de los colorantes artificiales contenidos en estas bebidas, los encuestados responden que algunos problemas de salud pueden ser cáncer, problemas renales, alergias, osteoporosis, obesidad, gastritis, diabetes e hiperactividad. (ver anexo N° 4). Además el 20% de los encuestados manifiestan tener familiares con problemas de salud relacionados al consumo de colorantes artificiales.

Cuadro N° 17. Cantidad de encuestados con familiares que presentan problemas de salud relacionado al consumo de los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6.

Población	Si	No
Docentes	4	4
Estudiantes	13	76
Administrativos	3	2
Total	20	82

5.4 Selección del puesto de venta y sabores a analizar de las tres marcas preferidas de bebidas no carbonatadas.

Según los resultados de la encuesta, las tres marcas comerciales de bebidas no carbonatas preferidas por la población de la Facultad de Química y Farmacia y que rotulan los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6 FD&C son: Del Valle, Frutado y Super Juoó (ver anexo N° 10), las muestras se adquirieron en la entrada por la Facultad de Odontología, ya que aquí existe una mayor demanda por la población de la Facultad de Química y Farmacia debido a su cercanía y también por la variedad de sabores y presentaciones de las marcas comerciales de bebidas no carbonatadas. Las presentaciones seleccionadas de cada una de estas marcas comerciales fueron las de menos de 1L por ser las más consumidas. De cada marca se adquirieron seis envases de un sabor específico tomando como criterio que en su etiqueta rotularan los colorantes en estudio.

Las marcas y sabores seleccionados para realizar los análisis se detallan en el cuadro N° 18.

Cuadro N° 18. Marcas y sabores seleccionados de bebidas no carbonatadas para los análisis.

N°	Marca comercial	Sabor	Colorantes contenidos según etiquetado.
1	Del Valle	Mandarina	Amarillo N° 6
2	Súper Juoó	Naranja	Amarillo N° 6 y Amarillo N° 5
3	Frutado	Durazno	Amarillo N° 6

5.5 Identificación y cuantificación de los colorante amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en las bebidas no carbonatadas seleccionadas.

Previamente al análisis, se efectuaron dos pruebas preliminares, para comprobar la efectividad del método. En la primera prueba preliminar los análisis se efectuaron sobre placas de silica gel con base de vidrio de

20x20 cm, las cuales fueron preparadas en el momento de su utilización, para la extracción de los colorantes y preparación de las muestras se siguió el procedimiento anteriormente descrito. Las placas se colocaron en cámaras cromatográficas, y se dejaron eluir hasta $\frac{3}{4}$ partes con el sistema solvente indicado; posteriormente se rasparon las manchas, se diluyeron con 10 mL de agua destilada y se leyeron en el equipo HACH Spectronic 2,700. La segunda prueba preliminar se realizó únicamente cambiando las placas cromatográficas, siempre de 20x20 cm pero prefabricadas con base de aluminio. Para leer las placas se cortaron y se les hizo el tratamiento antes escrito. La muestra que se ensayó en ambas pruebas preliminares fue la marca comercial Del Valle en sabor naranja y sabor mandarina.

i. Prueba preliminar usando placas cromatográficas de vidrio con silica gel 254.

Para ello se eligieron dos sabores de la presentación de 500 mL de jugos Del Valle, un envase de bebida sabor a mandarina y otra con sabor a naranja los que contienen los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C respectivamente. Las placas cromatográficas se elaboraron con silica gel 254 de 20 x 20 cm en soporte de vidrio se utilizó como fase móvil Isopropanol : amoniaco (4:1).

Se inyectaron 0.1 mL de cada estándar de concentraciones 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 5.0 mg/ mL, y cada muestra en la placa. Se dejó eluir $\frac{3}{4}$ partes del solvente y se retiró la placa cromatográfica, se secó y se observó que las manchas obtenidas de las muestras eran prácticamente iguales en color y forma con respecto a los estándares, pero las manchas de los estándares eran mucho más grandes que indicaban una concentración alta del colorante (ver figura N° 15).

Tabla N° 1. Desplazamiento y Rf de los estándares y muestras de amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en las placas cromatográficas.

Concentración de estándares y muestras		Desplazamiento amarillo N° 5 (cm)	Rf para amarillo N°5	Desplazamiento amarillo N° 6 (cm)	Rf para amarillo N° 6
Estándares	0.50 mg/ mL	6.0	0.40	6.5	0.47
	0.16 mg/ mL	6.1	0.41	7.1	0.51
	0.12 mg/ mL	6.0	0.40	7.0	0.51
	0.08 mg/ mL	6.2	0.41	7.2	0.52
	0.04 mg/ mL	6.1	0.41	7.0	0.51
Muestras	Del Valle (mandarina)	No rotula	No rotula	7.0	0.51
	Del Valle (naranja)	6.1	0.41	6.9	0.50
	Frente de sistema	15		13.7	

Para obtener los Rf de los estándares de amarillo N° 5 y amarillo N° 6 y las respectivas muestras se hizo el siguiente procedimiento utilizando la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el estandar o la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

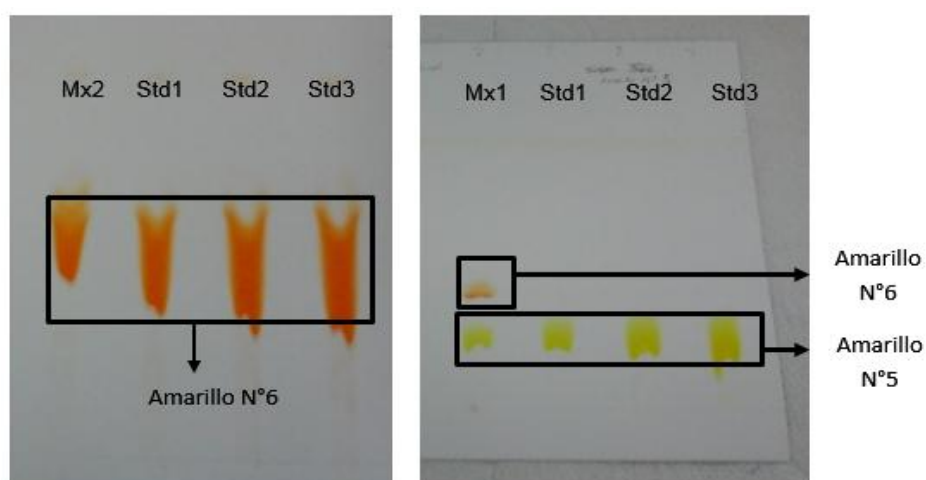


Figura N° 14. Desplazamiento de los colorantes contenido en las muestras del Jugo Del Valle mandarina (izquierda) y naranja (derecha) y sus estándares en la placa de cromatográfica de silica gel.

Ejemplo para calcular los coeficientes de reparto Rf para el estándar amarillo N° 6 y la muestra de bebida sabor mandarina de la marca del valle.

$$Rf_{std1} = \frac{6.5}{13.7} = 0.47$$

$$Rf_{std2} = \frac{7.1}{13.7} = 0.52$$

$$Rf_{std3} = \frac{7.0}{13.7} = 0.51$$

$$Rf_{std4} = \frac{7.2}{13.7} = 0.52$$

$$Rf_{std5} = \frac{7.0}{13.7} = 0.51$$

$$Rf_{muestra} = \frac{6.9}{13.7} = 0.50$$

La tabla N° 1 muestra los resultados de los Rf obtenidos durante la prueba preliminar con los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C, los Rf teóricos encontrados en la literatura mencionan que se encuentran entre 0.47- 0.48 para el amarillo N° 6 FD&C y 0.36- 0.39 para el amarillo N° 5 FD&C.

Al realizar la comparación de los Rf (Coeficiente de reparto) obtenido de los estándares con los Rf de las muestras se obtuvo una diferencia mínima. (± 0.01)

Para la cuantificación de los colorantes se colocó el raspado de la mancha en un tubo de ensayo al que se adicionó 5.0 mL de agua destilada se centrifugó y al sobrenadante se le determinó la absorbancia en un equipo UV- Visible HACH DR2700 para amarillo N° 5 a una longitud de onda de 427 nm y para el amarillo N° 6 a 482 nm. Se utilizó como blanco una porción similar de silica gel en la cual solo había corrido el sistema solvente.

Las longitudes de onda obtenidos se muestran en la Tabla N° 2, las concentraciones de los estándares se modifican por la dilución realizada a la cantidad aplicada de cada estándar.

Tabla N° 2 Resultados de las absorbancia de los estándares y las muestras para los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.

Concentración de estándares y muestras		Absorbancia para amarillo N° 5 a 427 nm	Absorbancia para amarillo N°6 a 482 nm
Estándares	0.1 mg/ mL	> 3.5	3.025
	0.032 mg/ mL	1.153	1.503
	0.024 mg/ mL	0.818	1.004
	0.016 mg/ mL	0.664	0.713
	0.008 mg/ mL	0.281	0.267
Muestras	Del Valle sabor mandarina	N/A	0.220
	Del Valle sabor Naranja	0.110	0.038

Con las absorbancias obtenidas se elaboró una curva de estándares tanto para amarillo N° 5 y amarillo N° 6, (ver figuras N° 15 y N° 16).

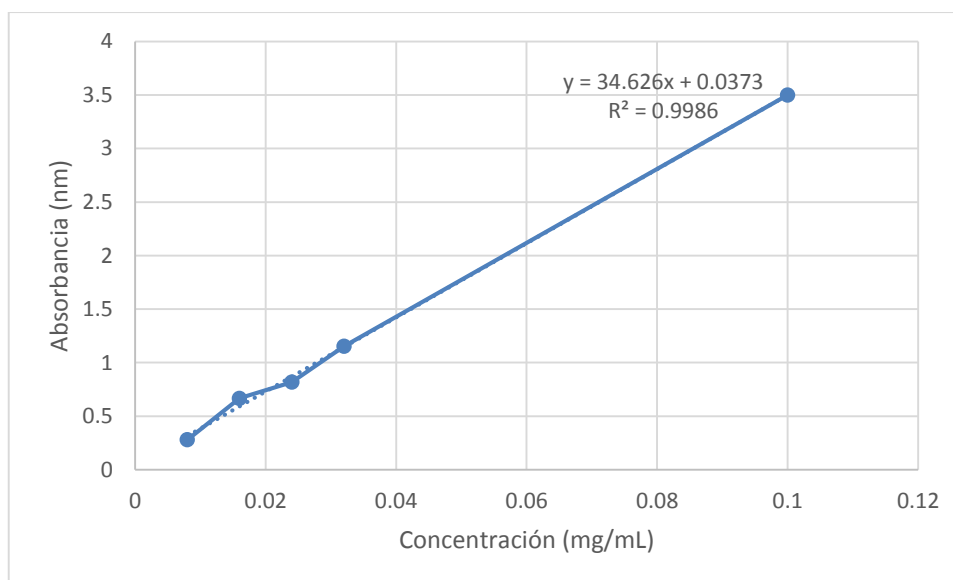


Figura N° 15. Curva de estándares para el colorante amarillo N° 5 de la prueba preliminar i.

La linealidad de la curva presenta un R^2 (coeficiente de determinación) bajo ya que la absorbancia obtenida de los dos estándares más concentrados sobrepasan 1.0 que de acuerdo a la bibliografía consultada, menciona que estas lecturas no son confiables esto abonado a que las absorbancias obtenidas por las muestras son más bajas que la del estándar de menor concentración, sugiriendo que se debe disminuir las concentraciones de los estándares utilizados.

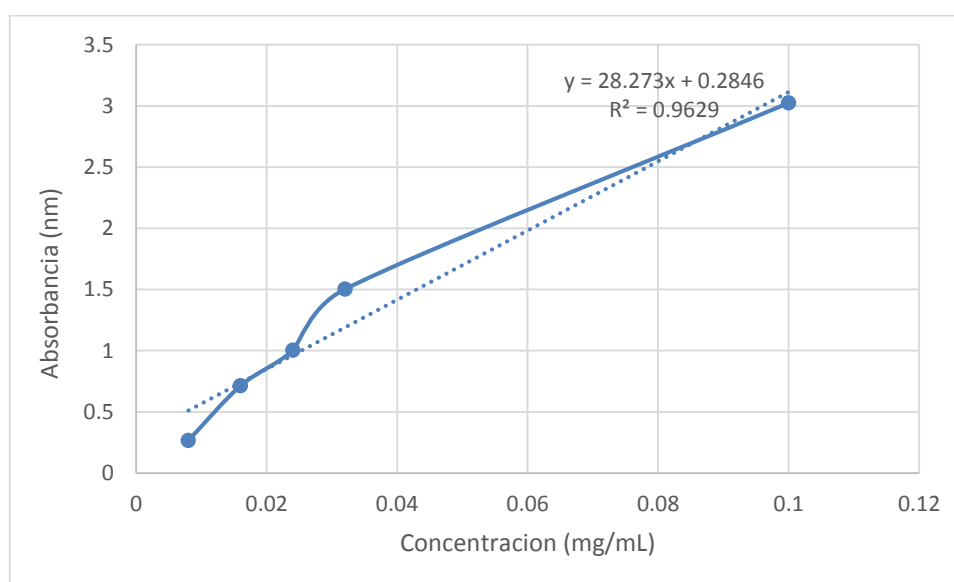


Figura N° 16. Curva de estándares para el colorante amarillo N°6 de la prueba preliminar i.

La concentración de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C en las muestra se calculó utilizando la fórmula de la Ley de Beer.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} * \text{concentracion del estandar}}{\text{Absorbancia del estandar}} * FD$$

Cálculo de las concentraciones de amarillo N° 5 en la bebida con sabor a naranja de la Marca del Valle (cálculo de Factor de Dilución ver anexo N° 5)

$$\text{Concentracion} = \frac{0.110 * 0.008 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{0.281} * 50$$

$$\text{Concentración} = 0.1566 \text{ mg/ mL}$$

Eso quiere decir que hay 0.1566 mg de colorante amarillo N° 5 en una alícuota tomada de 100 mL de bebida

$$\begin{array}{l} 0.1566 \text{ mg} \text{ -----} 100 \text{ mL} \\ X \quad \quad \quad \text{-----} 1000 \text{ mL} \end{array}$$

X= 1.57 mg de colorante amarillo N° 5 FD&C en 1000 mL o 1 Litro de bebida.

Eso quiere decir que hay 1.57 mg de colorante amarillo N° 5 FD&C en 1 Litro de bebida. Los resultados obtenidos de las concentraciones de los colorantes en las bebidas analizadas se muestran en la tabla N° 6 expresado en mg/L.

Tabla N° 3 Concentraciones de los colorantes amarillo N° 5 y N°6 FD&C contenido en las bebidas de la marca del Valle con sabor a mandarina y naranja.

Marca y sabor	Del Valle mandarina	Del Valle naranja
Contenido de colorante amarillo N° 5 (mg/ L)	No rotula	1.57 mg / L
Contenido de colorante amarillo N°6 (mg /L)	3.30 mg / L	0.57 mg/ L
Total de colorante	3.30 mg / L	2.14 mg/L

Los resultados obtenidos en esta prueba preliminar indican que las bebidas no sobrepasan el límite de 200 mg/L como colorante único ni combinados establecidos por la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.18.01:01, Productos Alimenticios. Bebidas No Carbonatadas Sin Alcohol. Especificaciones.

ii. Prueba Preliminar N° 2

Prueba preliminar usando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 254 en base de aluminio.

Se eligió una presentación de 500 mL de jugos del Valle sabor mandarina que rotulaba colorante amarillo N° 6 FD&C. Se utilizó placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 254 en base aluminio de 20 x 20 cm y se utilizó como eluyente Isopropanol: Amoniaco (4:1). Para esta segunda prueba se prepararon nuevos estándares, con el objetivo de mejorar la linealidad de la curva, con las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/L. El colorante de la bebida fue extraído como se indicó en la metodología. Se inyectaron 0.1 mL de cada estándar y cada muestra en la placa. Se dejó eluir 3/4 partes del solvente y se retiró la placa cromatográfica, se secó y se observó que las manchas obtenidas de las muestras eran prácticamente iguales en color y forma con respecto a los estándares, pero los estándares de mayor concentración presentaban marcas más grandes. Como resultado del desplazamiento de los estándares y muestras en la placa cromatográfica se obtuvieron los respectivos Rf y absorbancias que se muestran en la tabla N° 4.

Tabla N° 4 Resultados de Rf y absorbancia de estándares para amarillo N° 6 FD&C.

Concentración del Estándar aplicado	Desplazamiento (cm)	Rf	Absorbancia
0.5 mg/ mL	7.0	0.50	0.439
1.0 mg/ mL	7.2	0.51	0.809
1.5 mg/ mL	7.1	0.50	1.081
Solvente	14.0	---	-----
2.0 mg/ mL	7.0	0.51	1.427
2.5 mg/ mL	7.1	0.51	1.708
Solvente	13.8	----	-----

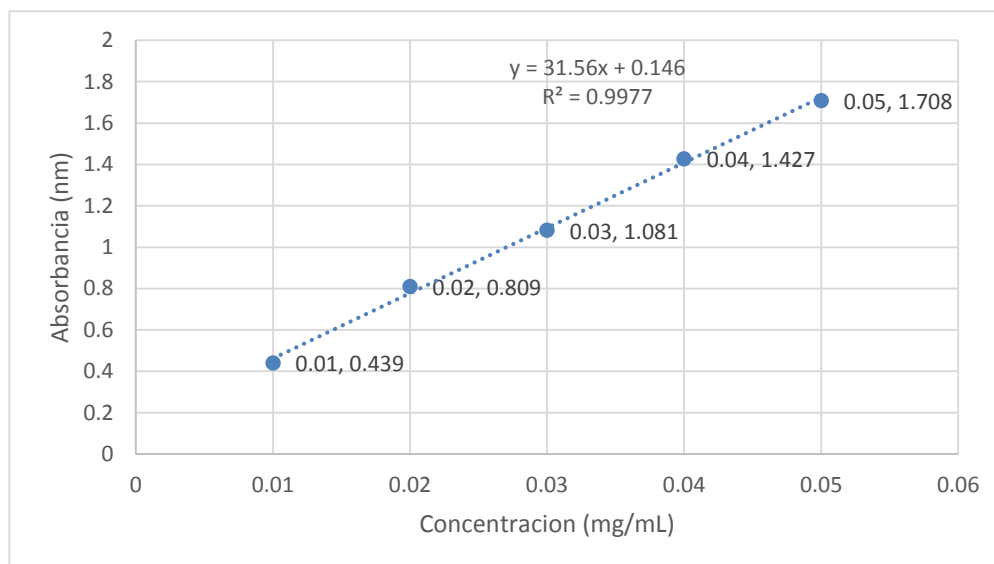


Figura N° 17 Curva de calibración para estándares de amarillo N° 6 FD&C. usando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 60 F₂₅₄ en base de aluminio

Con los resultados obtenidos en la prueba preliminar N° 2, se logró comprobar que el método al utilizar placas de sílica gel con base de Aluminio 60 F₂₅₄ fue efectivo al separar los colorantes en estudio.

Tabla N° 5 Resultados de absorbancias y R_f de la marca comercial Súper Juoó que rotula los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 FD&C.

Marca comercial, Super Juoó Sabor Naranja			
Colorante artificial: Amarillo N° 6			
Muestra	R _f	Absorbancia	Concentración de colorante en 1 Litro de bebida
Mx ₁	0.49	0.230	2.10 mg
Mx ₂	0.50	0.220	2.00 mg
Mx ₃	0.50	0.212	1.93 mg
Mx ₄	0.49	0.215	1.96 mg

Tabla N° 5. Continuación

Mx ₅	0.50	0.225	2.05 mg
Mx ₆	0.50	0.218	1.99 mg
Promedio	0.50	0.220	2.0 mg

iii. Determinación cualitativa experimental

Usando placas cromatograficas prefabricadas de silica gel 60 F₂₅₄ en base de aluminio.

Se eligieron seis envases de un sabor elegido al azar de cada marca comercial de bebida que rotulaban en su etiqueta los colorantes en estudio, para la marca comercial Del Valle se seleccionó el sabor mandarina y para la marca Frutado el sabor durazno, ambas presentaciones de 500 mL de jugo y Super Juoó sabor naranja presentación de 600 mL, realizándose un pool con los seis envases de cada bebida. Se prepararon estándares de concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 mg/mL para ambos colorantes. Se realizaron tres extracciones de 100.0 mL de cada pool de bebida por marca a analizar, medidos con pipeta volumétrica y se identificó cada uno como réplica de pool A, B y C, esta extracción se realizó con lana desengrasada y posteriormente se inyectó 0.1 mL de cada estándar para amarillo N° 5 y N° 6 utilizando una jeringa de tuberculina de 1.0 mL, realizándose tres réplicas de cada extracción, y se dejó correr en la cámara cromatográfica, la tabla N° 6 muestra los R_f obtenidos para los estándares de amarillo N° 5, el R_f teórico para este colorantes es de 0.36-0.39. Se obtuvo en el análisis valores muy cercanos a los teóricos (0.34- 0.38). Se utilizó como blanco una porción cortada de la placa de silica gel con 5 ml de agua.

Tabla N° 6. Rf de los estándares de amarillo N° 5

Concentración de estándares de amarillo N° 5 aplicado en placa	Rf de estándares amarillo N°5	Absorbancia
0.005 mg/mL	0.38	0.155
0.010 mg/mL	0.37	0.343
0.015 mg/mL	0.37	0.550
0.020 mg/mL	0.35	0.743
0.025 mg/mL	0.36	0.977
0.030 mg/mL	0.34	1.276

Con estos resultados se elaboró la curva de estándares para amarillo N° 5 la cual se muestra en la figura N° 18.

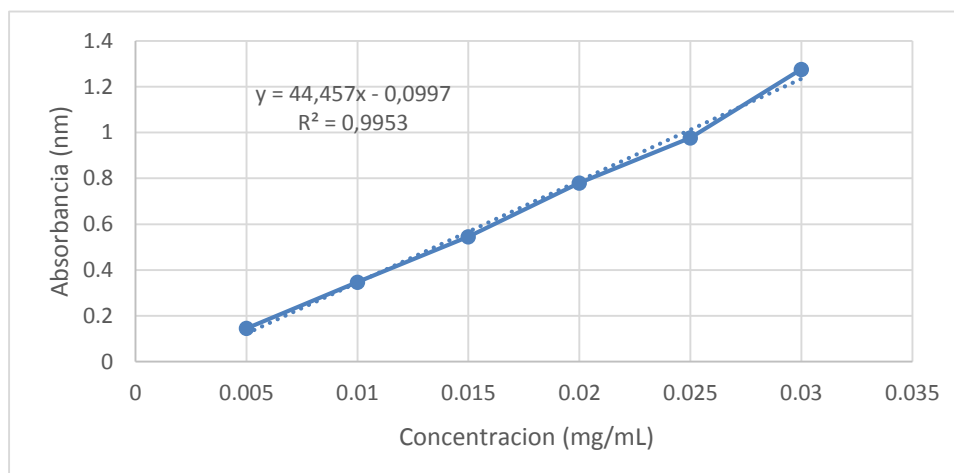


Figura N° 18 Curva de estándares de amarillo N° 5 utilizando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 60 F₂₅₄ en base de aluminio.

Tabla N° 7. Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la marca Súper Juoó sabor naranja para el amarillo N° 5 FD&C.

Marca comercial: Súper Juoó sabor naranja					
Colorante artificial: Amarillo N° 5					
Réplica del pool	Triplicado de la réplica	Rf teórico: 0.36-0.39		Absorbancia	Concentración (mg/L)
		Rf	Rf Promedio		
A	A ₁	0.37	0.36	0.064	1.03
	A ₂	0.36		0.062	1.00
	A ₃	0.36		0.062	1.00
B	B ₁	0.38	0.36	0.065	1.05
	B ₂	0.34		0.062	1.00
	B ₃	0.37		0.063	1.01
C	C ₁	0.37	0.37	0.064	1.00
	C ₂	0.36		0.065	1.05
	C ₃	0.37		0.062	1.00
Promedio total			0.36	0.065	1.02

La tabla N° 8 muestra los Rf obtenidos para los estándares de amarillo N° 6, donde el Rf teórico es de 0.47-0.48, en el análisis los valores fueron cercanos (0.46- 0.48) y se procedió de igual forma que para el colorante amarillo N° 5.

Tabla N° 8. Resultado para los estándares de amarillo N° 6.

Estándar amarillo N°6 aplicado en placa.	Rf de estándares amarillo N° 6	Absorbancia a 482 nm
0.005 mg/mL	0.47	0.222
0.010 mg/mL	0.48	0.488
0.015 mg/mL	0.48	0.704
0.020 mg/mL	0.47	0.930
0.025 mg/mL	0.47	1.181
0.030 mg/mL	0.46	1.342

Con los resultados obtenidos se diseñó la curva de estándares para amarillo N°6 la cual se muestra en Figura N° 19.

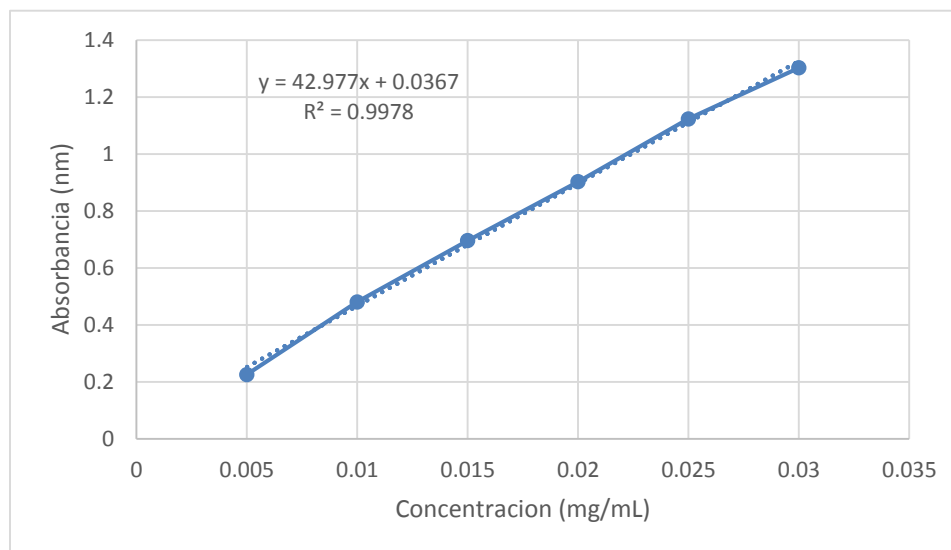


Figura N° 19 Curva de calibración para los estándares de Amarillo N°6 utilizando placas cromatográficas prefabricadas de sílica gel 60 F₂₅₄ en base de aluminio.

Tabla N° 9. Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la marca Súper Juoó sabor naranja para el amarillo N° 6 FD&C.

Marca comercial: Súper Juoó sabor naranja					
Colorante artificial: Amarillo N° 6					
Réplicas del pool	Triplicado de la réplica	Rf teórico: 0.47-0.48		Absorbancia	Concentración (mg/L)
		Rf	Rf Promedio		
A	A ₁	0.48	0.48	0.018	0.2027
	A ₂	0.48		0.016	0.1802
	A ₃	0.48		0.016	0.1802
B	B ₁	0.47	0.47	0.017	0.1914
	B ₂	0.48		0.017	0.1914
	B ₃	0.47		0.016	0.1802
C	C ₁	0.48	0.48	0.017	0.1914
	C ₂	0.48		0.018	0.2027
	C ₃	0.47		0.017	0.1914
Promedio total			0.48	0.017	0.1901

Tabla N° 10. Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo del jugo marca Frutado sabor durazno para el amarillo N° 6 FD&C.

Marca comercial: Frutado sabor durazno					
Colorante artificial: Amarillo N° 6					
Réplicas del pool	Triplicado de la réplica	Rf teórico: 0.47-0.48		Absorbancia	Concentración (mg/L)
		Rf	Rf Promedio		
A	A ₁	0.48	0.48	0.041	0.462
	A ₂	0.48		0.038	0.428
	A ₃	0.48		0.040	0.450
B	B ₁	0.48	0.47	0.037	0.420
	B ₂	0.47		0.040	0.450
	B ₃	0.47		0.037	0.420
C	C ₁	0.47	0.48	0.042	0.473
	C ₂	0.48		0.039	0.440
	C ₃	0.48		0.037	0.420
Promedio total			0.47	0.039	0.440

Tabla N° 11. Resultados del análisis cualitativo y cuantitativo del jugo marca Del Valle sabor mandarina para el amarillo N° 6 FD&C.

Marca comercial: Del Valle sabor mandarina					
Colorante artificial: Amarillo N° 6					
Réplicas del pool	Triplicado de la réplica	Rf teórico: 0.47-0.48		Absorbancia	Concentración (mg/L)
		Rf	Rf Promedio		
A	A ₁	0.48	0.48	0.207	2.33
	A ₂	0.48		0.213	2.40
	A ₃	0.48		0.209	2.36
B	B ₁	0.48	0.48	0.208	2.34
	B ₂	0.48		0.212	2.40
	B ₃	0.48		0.206	2.32
C	C ₁	0.47	0.48	0.207	2.33
	C ₂	0.48		0.210	2.36
	C ₃	0.48		0.209	2.35
Promedio total			0.48	0.209	2.35

Tabla N° 12. Promedio de las concentraciones de las tres bebidas no carbonatadas que rotulan los colorantes amarillo N°5 y N°6

Marca comercial	Amarillo N°5 concentración promedio mg/L	Amarillo N°6 concentración promedio mg/L
Súper Juoó	1.02 mg / L	0.1901 mg/L
Frutado	No rotula	0.440 mg/L
Del Valle	No rotula	2.350 mg/L

5.6 Análisis estadístico de datos por el método ANOVA

5.6.1 Análisis estadístico de datos (ANOVA) para el colorante amarillo N° 5.

El método estadístico ANOVA sirvió en nuestra investigación para ver las desviaciones de los resultados de las réplicas. Para el análisis de datos se planteó como hipótesis nula (H_0) e hipótesis alternativa (H_i) lo siguiente:

H_0 = No existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas durante el análisis para el colorante amarillo N° 5 FD&C en las réplicas para la misma marca de bebida no carbonatada.

H_i = Si existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas durante el análisis para el colorante amarillo N° 5 FD&C en las réplicas para la misma marca de bebida no carbonatada.

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3$$

$$H_i: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2 \neq \sigma^2_3$$

Con el objetivo de determinar si existe o no diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas en las réplicas para la misma marca de bebida no carbonatada durante el análisis para el colorante amarillo N° 5 FD&C.

El valor resultante (F) se comparó con el valor Crítico F, si es mayor se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

En todos los resultados obtenidos (ver anexo N° 11) por el análisis de varianza de un factor ANOVA el valor de prueba (F) es menor que el valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas durante el análisis para el colorante amarillo N° 5 FD&C en las réplicas para la misma marca de bebida Súper Juoo sabor naranja.

5.6.2 Análisis estadístico de datos (ANOVA) para el colorante amarillo N° 6.

Para el análisis de datos utilizando el método ANOVA para el amarillo N° 6 en las marcas de bebida super Juoo, Frutado y Del Valle se planteó como hipótesis nula (Ho) e hipótesis alternativa (Hi) lo siguiente:

Ho= No existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas durante el análisis para el colorante amarillo N° 6 FD&C en las réplicas para la misma marca de bebida no carbonatada.

Hi= Si existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas durante el análisis para el colorante amarillo N° 6 FD&C en las réplicas para la misma marca de bebida no carbonatada.

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3$$

$$H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2 \neq \sigma^2_3$$

Con el objetivo de determinar si existe o no diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas en las réplicas para la misma marca de bebida no carbonatada durante el análisis para el colorante amarillo N° 6 FD&C.

El valor resultante (F) se comparó con el valor Crítico F, si es mayor se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

En todos los resultados obtenidos (ver anexo N° 11) por el análisis de varianza de un factor ANOVA el valor de prueba (F) es menor que el valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones obtenidas en las marcas de bebidas Súper Juoo, Frutados y jugos Del Valle durante el análisis para el colorante amarillo N° 6 FD&C en las réplicas para la misma marca de bebida.

De acuerdo a los resultados finales, las concentraciones tanto de amarillo N°5 como la de amarillo N° 6, están dentro del límite establecido por la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.18.01:01, la cual establece un límite de 200 mg/L para estos dos colorantes artificiales ya sea combinado o individuales. Con respecto a los Rf de cada una de las muestras, se observa también que estos se encuentran dentro del rango teórico reportado bibliográficamente ⁽¹⁰⁾, por lo tanto dichas bebidas son aptas para su consumo en cuanto a la concentración de colorantes. Pero estos datos no garantizan que una persona no pueda desarrollar algún tipo de reacción alérgica debido al consumo de estos colorantes.

5.7 Charla Informativa (socialización de los resultados).

Se brindó una charla educativa en la Facultad de Química y Farmacia, la cual tuvo una duración aproximadamente de una hora, se hizo una presentación en formato Power Point (ver anexo 12), en donde se dieron a conocer los resultados de la investigación y se destacaron los efectos a la salud ocasionado por el consumo de colorantes artificiales

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo al total de encuestas realizadas se determinó que un 85% de la población encuestada desconocen el daño a la salud que pueden llegar a ocasionar los colorantes artificiales amarillo N° 5 y amarillo N° 6, mientras que un 15% si esta consiente de los efectos que pueden llegar a provocar en la salud.
2. Se determinó que existe un buen porcentaje de la población que tiene problemas en la salud relacionados al consumo de los colorantes ya que un 20% de los encuestados manifestó que conoce por lo menos algún familiar con problemas relacionados al consumo de los colorantes
3. Por medio del método de cromatografía de capa fina se identificaron los colorantes artificiales contenidos en las tres marcas de bebidas no carbonatadas analizadas, corroborándose de esta manera por medio de los Rf la presencia de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 declarados en la etiqueta de estas bebidas.
4. La cantidad de los colorantes artificiales amarillo N° 5 y N° 6 contenidos en las tres marcas de bebidas analizadas cumplen con la normativa ya que no sobrepasan el límite máximo de 200 mg/L establecido por la Norma Salvadoreña Obligatoria 67.18.01:01 Productos Alimenticios. Bebidas No Carbonatadas Sin Alcohol. Especificaciones.
5. Se determinó que no existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones obtenidas con respecto a las réplicas realizadas del pool para la misma marcar comercial de bebida no carbonatada analizada que contienen los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 lo cual indica que la

variabilidad entre las concentraciones encontradas de las diferentes replicas es poca y que la concentración encontrada para cada pool de bebida es relativamente la misma

6. Se determinó que la bebida no carbonatada que contiene la mayor cantidad de colorante amarillo N° 6 es la bebida de la marca comercial jugos Del Valle sabor mandarina con 2.4 mg/L, luego jugos Frutado sabor durazno con 0.44 mg/L y por ultimo Súper Juoo sabor naranja con 0.19 mg/L y 1.02 mg/L para amarillo N° 5 pero que cuya concentraciones no sobrepasa los límites establecidos por las normas salvadoreñas
7. La cantidad de colorante Amarillo N° 5 y Amarillo N° 6 encontrada en las tres marcas de bebidas analizadas es relativamente pequeña por lo cual no representa un alto riesgo a la salud, siempre y cuando no se sobrepase el Índice de Ingesta Diaria para estos dos colorantes.
8. No se puede establecer un límite máximo de consumo de estas bebidas ya que muchas veces son combinadas con otros productos que contienen colorantes artificiales aumentando la cantidad de colorante ingerida, llegando a sobrepasar el Índice de Ingesta Diaria.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Utilizar con fines didácticos en alguna unidad de aprendizaje donde sea aplicable el método empleado para la extracción, identificación y la cuantificación de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 utilizado en esta investigación como un método alternativo.
2. Validar este método como uso alternativo para futuras investigaciones comparando los resultados obtenidos con esta metodología para la cuantificación de los colorantes amarillo N° 5 y N° 6 con el método de cromatografía líquida de alta eficiencia.
3. Que las autoridades de salud informen a la población el daño a la salud que puede ocasionar el consumo excesivo de alimentos que contengan colorantes artificiales.
4. Que la defensoría del consumidor promueva la lectura correcta de las etiquetas de los productos alimenticios y que enfatizen sobre la necesidad que productos rotulen la cantidad de colorante adicionado y una advertencia en su etiqueta que los colorantes pueden causar alergia y no se debe sobre pasar el índice de ingesta diaria.
5. Que las instituciones de salud monitoreen periódicamente las empresas encargadas de elaborar alimentos que utilizan colorantes artificiales en sus productos para saber si están o no cumpliendo con lo establecido en la ley.

6. Que las empresas tomen conciencia y comiencen a sustituir los colorantes artificiales contenidos en sus productos por colorantes naturales ya que según estudios provocan menores efectos en la salud.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguiar, A. (2005). El Cuaderno de porque biotecnología. Los aditivos Alimentarios. Cuaderno N° 75. Edición N° 75-2005, 1-2, 6- 7.
2. Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1990), Food Compositions; Additives; Natural Contaminants: Color Additives, Volume Two Pag. 1115-1131
3. Bonilla, G. (1995). Estadística II. Métodos prácticos de inferencia estadística. San Salvador, El Salvador. UCA editores 2da edición. 91-92.
4. Carmona, Iris. (2013). De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Agrimundo, Inteligencia competitiva para el sector agroalimentario, Reporte N° 5. 1,3-4.
5. Cook, E. F. (1953). Farmacia practica de Remington, Manual para farmacéuticos, médicos y estudiantes. México: editorial hispanoamericana 10th edición.
6. García, G. (2001) Aditivos Alimentarios. Revista de la Universidad de Córdoba. España, 4-6.
7. González, M. E y Vigoa G. Y. (2007). Colorantes naturales de origen vegetal. Instituto de Investigaciones para la industria alimenticia. Ciencia y Tecnología de los alimentos Vol. 17. Cuba: Habana.No.1, 68-69.
8. Hart, F.L. Fisher, M.J. (1972). Análisis moderno de los alimentos. España: Zaragoza. Editorial Acriba, 532-542.

9. Ibañez, C. F. Torre, P. Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. Universidad Pública de Navarra, 3-4.
10. Kobylewski, S. y Jacobson, F. Michael. (2010). Food Dyes a Rainbow of Risks. Center for Science in the Public Interest, 33-42.
11. Lees, R. (1969). Manual de análisis de alimentos. España Zaragoza. Editorial Acriba, 21-26, 131-137.
12. Miller, D. Denis. (2003). Química de los alimentos, manual de laboratorio. Mexico. Limusa Wiley, 104-109.
13. Parra, Ortega. (2004). Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Chile.
14. Rouessac, A. (2003). Análisis Químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Madrid España. Editorial McGraw-Hill interamericana. 99-106, 137-156.
15. Velasquez, J. Giraldo, M. Montoya, L. (2003). Ingredientes al día. Los colorantes en alimentos. Departamento de investigación y desarrollo de Colorquímica, Publicado en EBSCO 24-26.
16. USP-30-NF-25 (2007) Farmacopea de los Estados Unidos de America, Formulario Nacional. The United States Pharmacopoeial Convention. Estados Unidos de América. 268-271, 663-665.

17. http://www.itsteziutlan.edu.mx/site2010/pdfs/2012/11/articulo_colorantes_abril_2012.pdf. (2012). Colores alimentarios en la salud. Consultado 19/03/2015
18. <http://es.slideshare.net/ToxiColaOrg/colorantes> Colorantes en alimentos y bebidas que alteran la conducta infantil. Consultado 20/03/2015.
19. http://www.whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_631_spa.pdf. (1978). Evaluación de ciertos aditivos alimentarios 21º del Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios. Ginebra. Suiza. Consultado 25/04/15.
20. http://www.defensoria.gob.sv/index.php=com_content&view=article&id=468:normas-salvadorenas-obligatorias-nso&catid=119. Norma Salvadoreña Obligatoria 67.18.01.01. Productos Alimenticios: Bebidas no Carbonatadas sin Alcohol. Especificaciones. Consultado 15/03/15.
21. <http://www.clubdarwin.net/seccion/ingredientes/sensient-technologies-brasil-recibe-mas-certificaciones-de-seguridad-alimentari>. (2009) ¿Por qué se certifica un color? La importancia de la certificación. Seguridad en Ingredientes SENASIENT. Consultado 15/03/2015.
22. http://www.ecured.cu/index.php/Colorante_alimentario. (2010) Consultado 17/05/2015
23. <http://www.fda.gov/Food/default.htm>. (2015) Consultado 20/04/2015.
24. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n3/sanchez.html>. Sánchez, R. (2013). La Química del Color en los Alimentos. Consultado 15/04/2015.

25. <http://www.uam.es>. (2013) Universidad autónoma de Madrid, Cromatografía en capa fina. Consultado 06/04/2015.
26. <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1097.1984.pdf> (2007). Norma Técnica Ecuatoriana. 1097 (1987). Bebidas gaseosas. Determinación de colorantes artificiales. Consultado 03/08/2015.
27. <http://www.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/15Manuals/FOOD%20ADDITIVES.pdf> . (2012). Manual of Methods of Analysis of Food, Food Additives. Food Safety and Standards Authority of India Ministry of Health and Family Welfare Government of India New. Delhi. Consultado 03/08/20015.
28. <https://www.google.com/> (2014). Cromatografía Planar. Consultado 04/08/2015.
29. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf. Conceptos fundamentales de cromatografía

ANEXO N°1

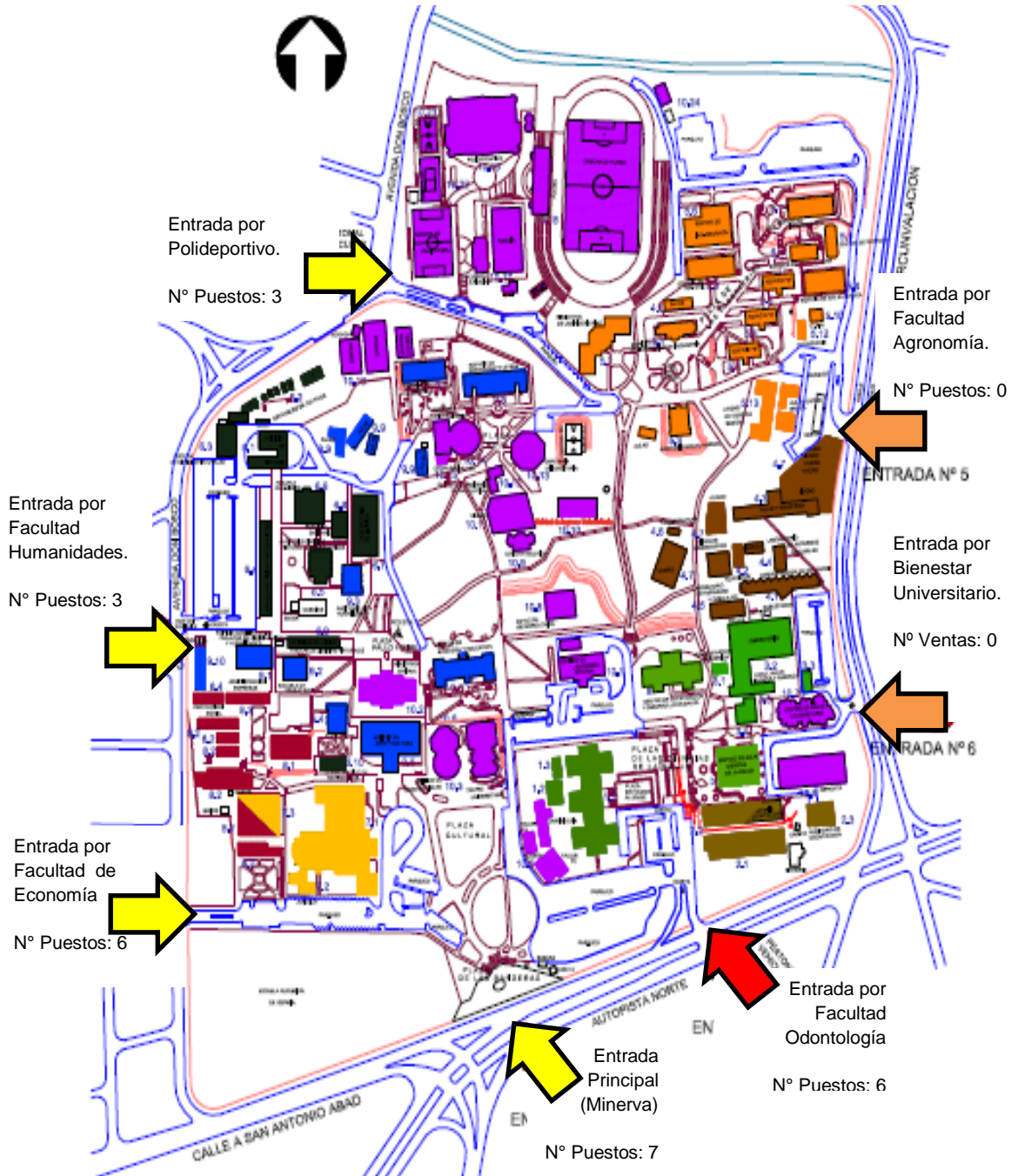


Figura N°21. Mapa del campus central de la Universidad de El Salvador con sus respectivos accesos.

Nota:  Punto donde se realizó el muestreo.  Puntos donde se comercializan las bebidas  Puntos sin ventas



ANEXO N°2



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

LISTA DE CHEQUEO

Objetivo:

Conocer las marcas, precios, sabores y presentaciones de las diferentes bebidas no carbonatadas que declaren en su etiqueta el contenido de los colorantes amarillo N° 5 y amarillo N° 6 comercializadas en los accesos (entrada y salida) del Campus Central de la Universidad de El Salvador.

- 1- Puntos de acceso al Campus Central de la Universidad de El Salvador

Punto de acceso N°	Localización	N° de puestos

- 2- Presentaciones, marcas comerciales, sabores y precios de bebidas no carbonatadas que declaran en su etiqueta el contenido de los colorantes amarillo N° 5 y amarillo N°6 que se comercializan en los accesos hacia el Campus Central de la Universidad de El Salvador.

Marca	Sabores	Presentación envase plástico (mL)	Precio. (\$)



ANEXO N°3
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ENCUESTA

Objetivo

Conocer las marcas, cantidad y frecuencia de consumo y conocimiento acerca de los colorantes artificiales utilizados en bebidas envasadas (jugos y refrescos) no carbonatadas con sabor artificial de mayor consumo por la población de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

INDICACION: Marque el cuadro con una "X" según sea su respuesta.

- 1) ¿Consumo usted alguna bebida envasada no carbonatada con sabor artificial (JUGOS)?

SI NO

Si su respuesta fue "SI", obvie solamente la pregunta 2.

- 2) Si su respuesta fue "NO", Indique la razón del por qué no consume bebidas no carbonatada con sabor artificial

No me gustan Me causa alergia

Otros: _____

- 3) Seleccione de las siguientes marcas la bebida no carbonatada (Refrescos y Jugos) que usted consume con mayor frecuencia

<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Jugos del valle		Super juoó		Jugos Frutados		Jugos La cascada	

- 4) Indique la cantidad y frecuencia con la cual consume dichas bebidas.

Cantidad de consumo cada vez que usted compra estas bebidas	Menos de 1Litro	1 Litro	Más de un Litro
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Frecuencia de consumo	Diariamente	Una vez a la semana	Tres veces a la semana
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- 5) ¿Por cuál de las siguientes características usted consume dichas bebidas? (marque todas las que usted considere)

COLOR	SABOR	PRECIO	SALUD	MARCA COMERCIAL
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- 6) ¿Conoce cuales implicaciones en la salud son causadas por el consumo de los colorantes artificiales contenidos en los jugos?

- 7) ¿Sabe de alguien en su familia que tenga algún problema de salud relacionado a los colorantes contenidos en este tipo de bebidas?

SI NO

ANEXO N° 4

**RESULTADOS DE LA ENCUESTA PARA CONOCER LAS MARCAS,
CANTIDAD, FRECUENCIA DE CONSUMO Y CONOCIMIENTO ACERCA DE
LOS COLORANTES ARTIFICIALES UTILIZADOS EN BEBIDAS NO
CARBONATADAS CON SABOR ARTIFICIAL DE MAYOR CONSUMO
REALIZADA EN LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

1- ¿Consume usted alguna bebida envasada no carbonatada con sabor artificial?

Cuadro N° 19. Resultados de consumo de bebidas envasadas con sabor artificial por sectores.

Encuestados	Si consume	No consume
Estudiantes	77	8
Docentes	14	6
Administrativos	11	3
TOTAL	119	

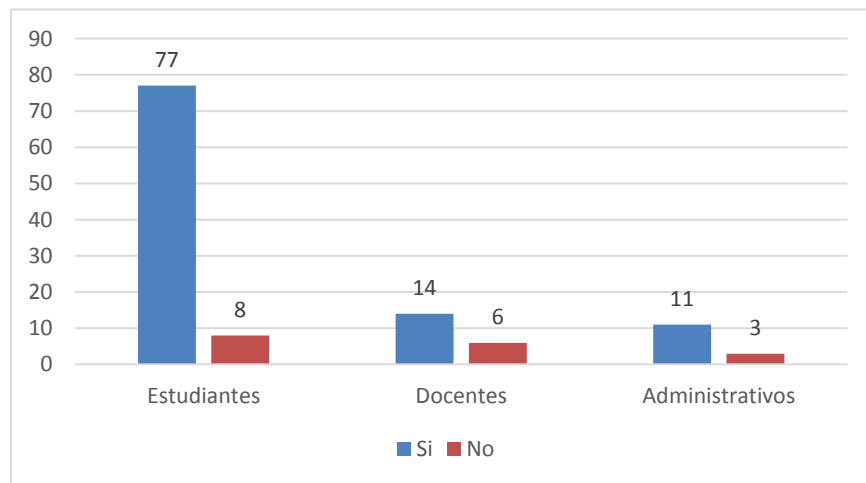


Figura N° 22 Grafica que muestra los resultados del consumo de bebidas envasada con sabor artificial por sectores

2- Si su respuesta fue “NO” indique la razón del por qué no consume este tipo de bebida no carbonatada con sabor artificial.

Cuadro N° 20. Razones por las que no se consumen este tipo de bebida.

Encuestados	No me gusta	Me causa alergia
Estudiantes	8	0
Docentes	3	1
Administrativos	4	1
TOTAL	17	

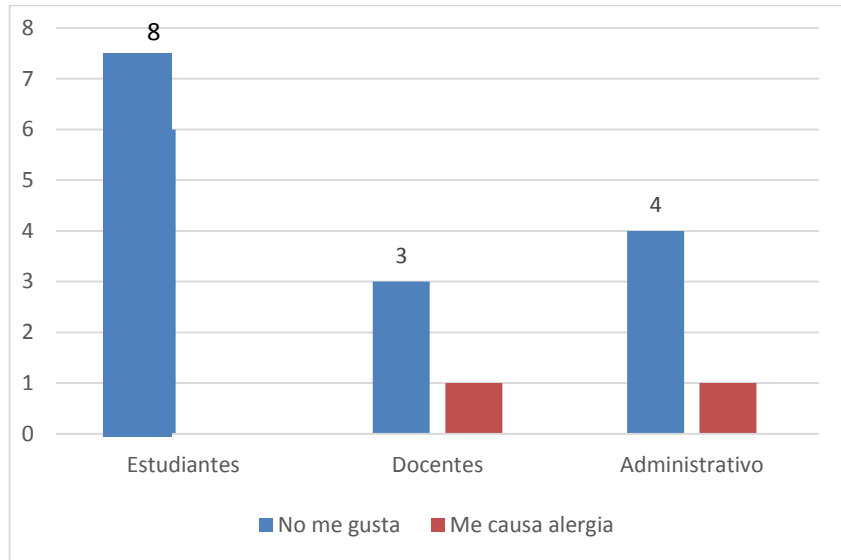


Figura N° 23 Gráfico que muestra las razones por las que no se consume este tipo de bebidas por sector. Nota: considera que son dañinos, solo consume bebidas naturales

3- Seleccione de las siguientes marcas, la bebida no carbonatada (refrescos y jugos) que usted consume con frecuencia.

Cuadro N° 21 Marca de bebida no carbonatada de mayor consumo en cada sector.

	Del Valle	Súper Juoó	Frutado	La Cascada
Estudiantes	48	13	18	7
Docentes	6	0	3	0
Administrativos	1	2	3	1
TOTAL	55	15	24	8

4- Indique la cantidad y frecuencia con la cual usted consume dichas bebidas
Cuadro N° 22 Frecuencia de consumo de estas bebidas por sector.

Frecuencia	Diariamente	Una vez a la semana	Tres veces a la semana
Encuestado			
Estudiantes	8	58	19
Docentes	0	10	0
Administrativos	0	6	1
TOTAL	2	66	16

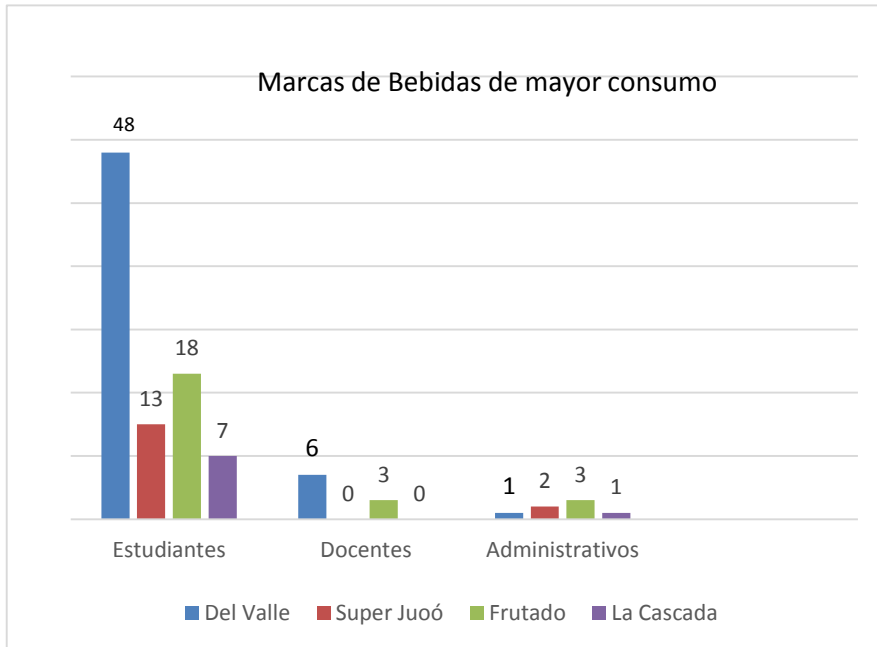


Figura N° 24 Gráfico que muestra la marca de bebida no carbonatada que es mayor consumida por cada sector.

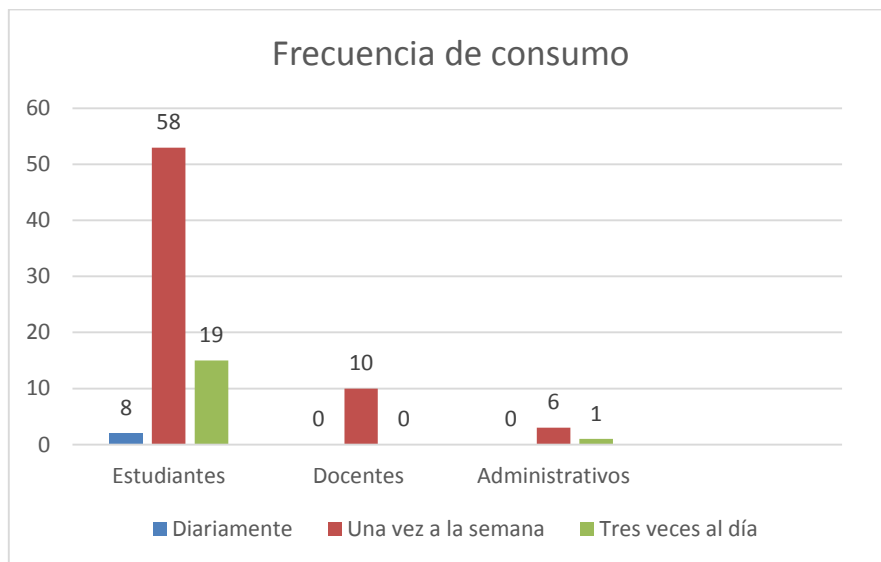


Figura N° 25 Gráfico que muestra la marca de bebida no carbonatada que es mayor consumida por cada sector.

Cuadro N° 23 Cantidad de consumo de estas bebidas por sector.

Encuestado	Cantidad		
	Menos de 1L	Un litro	Más de 1L
Estudiantes	72	8	5
Docentes	10	0	0
Administrativos	7	0	0
TOTAL	89	8	5

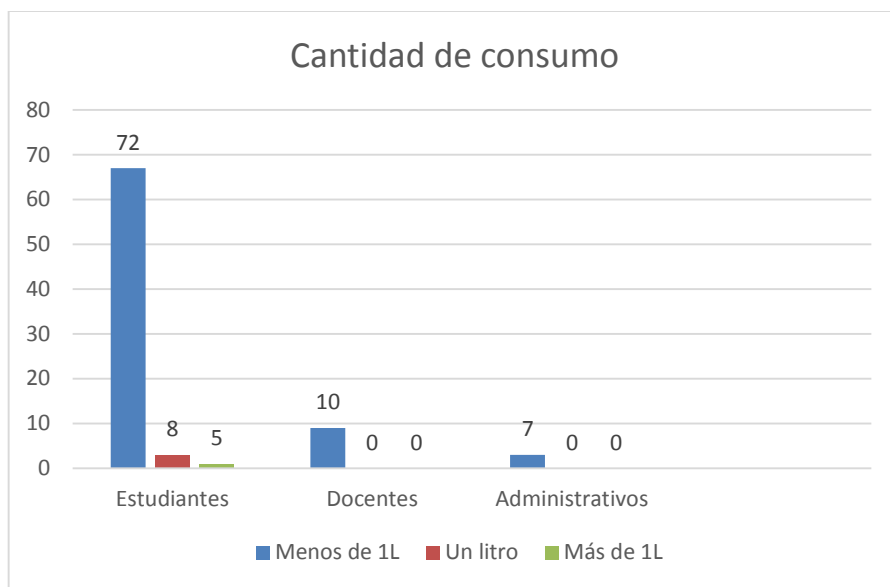


Figura N° 26. Gráfico que muestra la cantidad de consumo de estas bebidas por sector.

5- ¿Conoce cuáles implicaciones en la salud son causadas por el consumo de los colorantes artificiales contenidos en los jugos?

Cuadro N° 23 Sectores que conocen las implicaciones en la salud causada por los colorantes.

Encuestados	Si	No
Estudiantes	9	62
Docentes	4	4
Administrativos	1	4
Total	84	

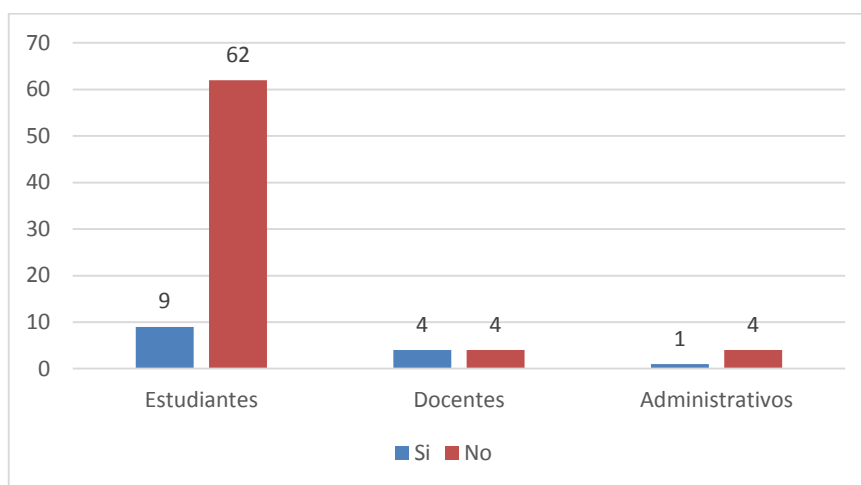


Figura N° 27 Gráfico que muestra los sectores que conocen las implicaciones en la salud causada por los colorantes.

6- ¿Conoce cuales implicaciones en la salud son causadas por el consumo de los colorantes artificiales contenidos en los jugos?

Cáncer, insuficiencia renal, gastritis, obesidad, osteoporosis, diabetes, alergias, problemas renales, reflujo.

7- ¿Sabe de alguien en su familia que tenga algún problema de salud relacionado a los colorantes contenidos en este tipo de bebidas?

Cuadro N° 24. Familiares de cada sector que tienen algún problema relacionado a los colorantes artificiales en bebidas.

Encuestados	Si	No
Docentes	5	3
Administrativos	4	8
Estudiantes	11	71
Total	20	82

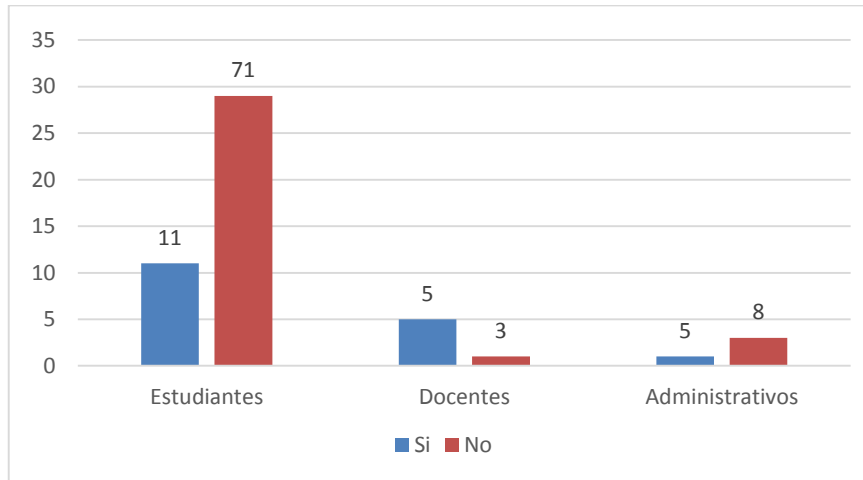


Figura N° 28. Grafica que muestra si un familiar de cada sector tienen algún problema relacionado a los colorantes artificiales en bebidas.

ANEXO N° 5

**MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS PARA LA EXTRACCION,
IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS COLORANTES AMARILLO
N° 5 Y N° 6**

Materiales y cristalería.

- Balones volumétricos de 100.0 mL
- Balones volumétricos de 25.0 mL
- Balones volumétricos de 10.0 mL
- Beakers de 150 mL
- Beakers de 100 mL
- Beakers de 25 mL
- Agitadores de vidrio
- Tubos de ensayo con tapón
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Pipeta de morh de 5 mL
- Perilla
- Gradillas para tubos de tubos ensayos
- Soxhlet
- Placas cromatográficas CCF
- Vidrio reloj
- Espátula
- Tanques cromatográficos

Equipo.

- Balanza analítica
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Centrifugadora
- Estufa
- Secadora de cabello

Reactivos.

- Ácido acético glacial 96%
- Hidróxido de amonio concentrado 28%
- Estándar (calidad alimenticia) de amarillo N° 5 FD&C
- Estándar (calidad alimenticia) de amarillo N° 6 FD&C
- Agua destilada
- Éter de petróleo
- Isopropanol

1) Preparación de solución madre de amarillo N°5 y N°6 FD&C

- a. En balanza analítica pesar 0.125 g de colorante amarillo N°5 y N°6 FD&C separadamente.
- b. Colocar el estándar colorante alimenticio respectivo en un balón de 25 mL
- c. Aforar con agua destilada
- d. Agregar a un frasco de plástico con tapadera, etiquetar y almacenar en un lugar alejado de la luz directa

2) Preparación de solución de Hidróxido de amonio 0.5N

- a. Medir 0.54 mL de Hidróxido de amonio concentrado con probeta
- b. Agregar a un balón volumétrico de 100.0 mL
- c. Aforar con agua destilada
- d. Colocar la solución en un frasco de plástico, etiquetar y almacenar en un lugar fresco y fuera del alcance de la luz directa

3) Preparación de solución de ácido acético 5 N

- a. Medir 27.4 mL de ácido acético glacial con probeta
- b. Agregar a un balón volumétrico de 100.0 mL
- c. Aforar con agua destilada
- d. Colocar la solución en un frasco de plástico, etiquetar y almacenar en un lugar fresco y fuera del alcance de la luz directa.

4) Preparación de la fase móvil.

- Medir 80.0 mL de Isopropanol y colocarlo en el tanque cromatográfico.
- Medir 20.0 mL de hidróxido de amonio concentrado y colocarlo también en el tanque cromatográfico.
- Tapar bien el tanque cromatográfico dejar que sature la cámara cromatográfica.

Preparación de los estándares alimenticios de amarillo N°5 y amarillo N°6 a partir de la solución madre de 125 mg de colorante.

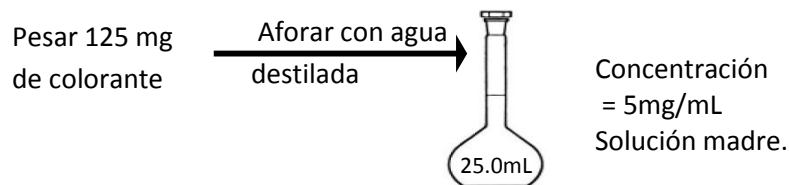


Figura N° 28 Preparación de estándares alimenticios de amarillo N° 5 y amarillo N°6

Preparación de los estándares de 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 mg/mL

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$V2 = \frac{C1 * V1}{C2}$$

Dónde:

C1= concentración de la solución madre

V1= volumen a preparar o tomar.

C2= concentración a preparar.

V2= volumen a tomar de solución madre.

- Para estándar de 0.25 mg /mL de colorante.

$$V_2 = \frac{10\text{mL} \cdot 2.5\text{mg/mL}}{5\text{mg/mL}} = 0.5\text{ mL de solución madre}$$

- Para estándar de 0.5 mg/mL de colorante.

$$V_2 = \frac{10\text{mL} \cdot 2.0\text{mg/mL}}{5\text{mg/mL}} = 1.0\text{ mL de solución madre.}$$

- Para estándar de 0.75 mg/mL de colorante.

$$V_2 = \frac{10\text{ mL} \cdot 1.5\text{ mg/mL}}{5\text{ mg/mL}} = 1.5\text{ mL de solución madre.}$$

- Para estándar de 1.0 mg/mL de colorante.

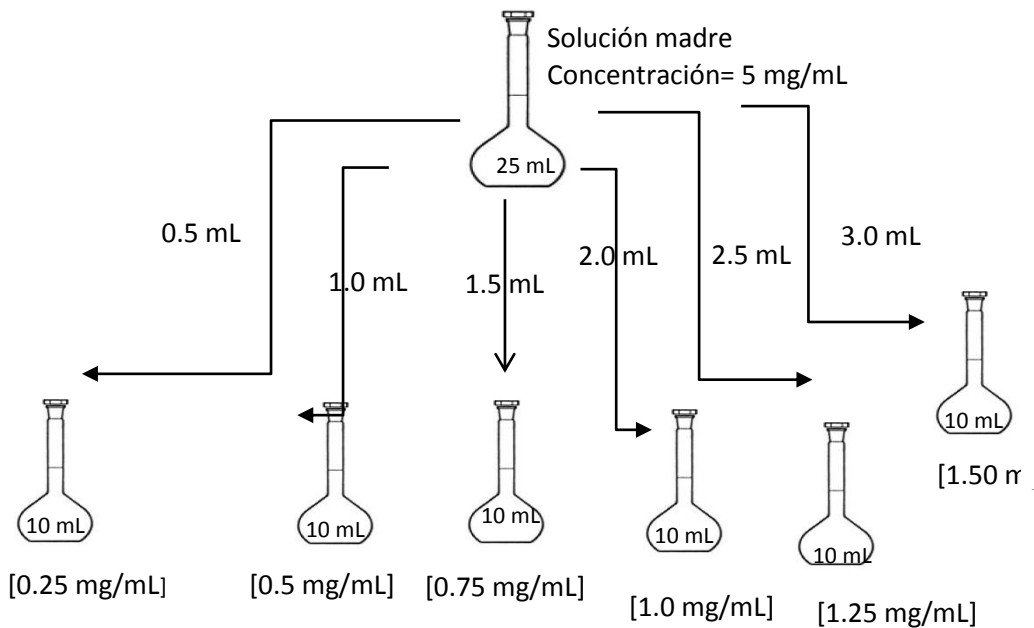
$$V_2 = \frac{10\text{ mL} \cdot 1.0\text{ mg/mL}}{5\text{ mg/mL}} = 2.0\text{ mL de solución madre.}$$

- Para estándar de 1.25 mg/mL de colorante.

$$V_2 = \frac{10\text{ mL} \cdot 0.5\text{ mg/mL}}{5\text{ mg/mL}} = 2.5\text{ mL de solución madre.}$$

- Para estándar de 1.50 mg/mL de colorante.

$$V_2 = \frac{10\text{ mL} \cdot 0.5\text{ mg/mL}}{5\text{ mg/mL}} = 3.0\text{ mL de solución madre.}$$



Aforar cada uno de los estándares con agua destilada

Figura N°29 Esquema de preparación de los estándares de 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.50 mg/mL.

Esquema de Factor de dilución de la muestra (FD)

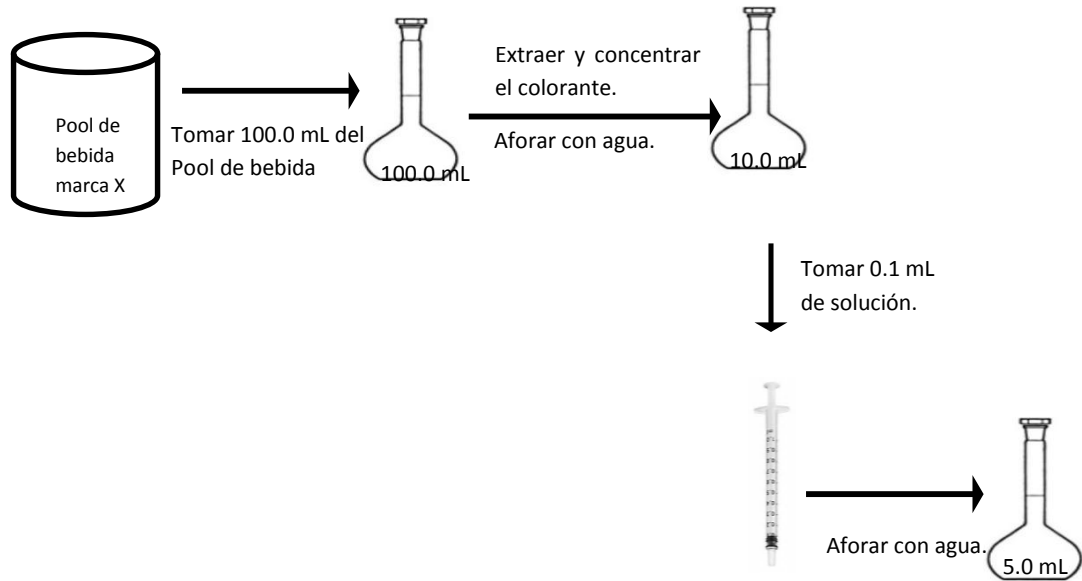


Figura N° 29. Esquema de dilución de la muestra.

Factor de Dilución.

$$FD = \frac{\text{Alicuotas hechas}}{\text{Alicuotas tomadas.}}$$

$$FD = \frac{5}{0.1} = 50$$

ANEXO N° 6
FORMATO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Tabla N° 13. Formato para la recolección de datos de las distancias recorridas por las muestras y el solvente

Marcas y sabor	Distancia recorrida Repetición A		Distancia recorrida Repetición B		Distancia recorrida Repetición C	
	Amarillo N°5	Amarillo N°6	Amarillo N°5	Amarillo N°6	Amarillo N°5	Amarillo N°6
Marca N°1 Sabor A						
Marca N°2 Sabor B						
Marca N°3 Sabor C						

Tabla N° 14. Formato para recolección de datos de las relaciones frontales (Rf) de los estándares de amarillo N°5 y N°6 y las muestras analizadas.

Concentración del Estándar	Rf amarillo N° 5	Rf amarillo N° 6
0.25 mg/ mL		
0.50 mg/ mL		
0.75 mg/ mL		
1.0 mg/ mL		
1.25 mg/ mL		
1.50 mg/ mL		
Marca N°1		
Marca N°2		
Marca N°3		

Tabla N° 15. Formato para la recolección de resultados de la absorbancia de las distintas muestras y estándares.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia repetición A (nm)		Absorbancia repetición B (nm)		Absorbancia repetición C (nm)	
	Amarillo N° 5 $\lambda=427\text{nm}$	Amarillo N° 6 $\lambda=482\text{nm}$	Amarillo N° 5 $\lambda=427\text{nm}$	Amarillo N° 6 $\lambda=482\text{nm}$	Amarillo N° 5 $\lambda=427\text{nm}$	Amarillo N° 6 $\lambda=482\text{nm}$
0.25 mg/mL						
0.50 mg/mL						
0.75 mg/mL						
1.0 mg/mL						
1.25 mg/mL						
1.50 mg/mL						
Marca N°1 Repetición A						
Marca N°2 Repetición B						
Marca N°3 Repetición C						

ANEXO N° 7

**METODO MODIFICADO DE LA AOAC PARA LA IDENTIFICACION DE LOS
COLORANTES ARTIFICIALES AMARILLO N° 5 Y N° 6 FD& C ⁽²⁾**

3. Color Additives

Sandra Bell, Associate Chapter Editor
Food and Drug Administration

Number in brackets following name of a color represents number of that color as listed in Society of Dyers and Colourists' "Colour Index," third edition, 1971.

In conformity with common usage, throughout this chapter the pigment designated as "amyl alcohol" is actually "isoamyl alcohol.")

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF COLOR ADDITIVES IN FOODS, DRUGS, AND COSMETICS

9307* Color Additives Separation and Identification of Pigments and Lakes Procedure Surplus 1970

See 34.001, 11th ed.

9308* Color Additives (Soluble) and Their Lakes Separation by Immiscible Solvents Surplus 1970

A. Synthetic Organic Color Additives in General —Final Action

See 34.002, 11th ed.

B. Dyes (Oil-Soluble) —Final Action

See 34.003, 11th ed.

C. Water-Soluble Dyes —Final Action

See 34.004-34.006, 11th ed.

9309 Color Additives (Synthetic Organic) in Foods Final Action

(Amaranth*, ponceau 3R*, ponceau SX*, erythrosine, orange I*, light green SF yellowish*, fast green FCF, guinea green B*, brilliant blue FCF, indigotine, naphthol yellow S*, sunset yellow FCF, tartrazine, yellow AB*, yellow OB*, orange SS*, and chili red XO*.)

A. Immiscible Solvent Method* —Surplus 1970

See 34.007-34.008, 11th ed.

*No longer permitted in the United States.

Column Chromatographic Method

B. Identification—Procedure

(a) *Oil-soluble dyes.*—Prep. soln of the isolated dye of suitable concn in CHCl_3 . Det. spectrophtric curve of this soln and compare curve with those of known dyes in CHCl_3 solns deid on same instrument under same conditions. If spectrophtric data cannot be correlated with that of known color, unknown color may be mixt. In such cases, proceed as in 966.21.

(b) *Water-soluble dyes.*—Prep. ca neut. soln of the dye in concn suitable for spectrophtric analysis with cells and instruments available. Divide soln into 3 portions and to 1 portion add few crystals of NH_4OAc . To second portion add HCl to make ca 0.1N. To third portion add NaOH soln to make ca 0.1N. Det. spectrophtric curves of the 3 solns and compare with corresponding curves of known dyes deid under same conditions on same instrument.

If spectrophtric data of unknown color cannot be correlated with that of a known color, unknown color may be mixt. In such cases subject unknown color soln to chromatgy. For oil-sol. colors, paper chromatgy procedure of JAOAC 35, 423(1952); 36, 802(1953), or following column chromatgy method may be used.

Ref.: USDA Bull. 1390, Supplement 1 (1930).

C. Preparation of Column

Lightly tamp glass wool plug into constricted end of chromatgy tube ca 100 cm long \times 2.54 cm diam. Prep. thin aq. slurry of ca 40 g *powd cellulose*, such as SolkaFloc BW 40 (Brown Co., Berlin, NH 03570), and pour into column. Let liq. drain as cellulose settles and add more slurry as needed until all is added. When liq. level drops almost to top of adsorbent bed, add wash of 20% NaCl soln. Just before last of this soln enters adsorbent, close constricted end of column. Column may be used immediately or may be stored for several weeks before use. (Column described is adequate for 0.5-2.0 mg total dye. Column size may be varied if more or less dye is present.)

D. Chromatographic Separation

To neut. aq. soln of the color add enough NaCl to make 20% soln. Pour soln into column so that adsorbent bed is not disturbed; then open constricted end of tube. When last of soln is ready to pass into adsorbent bed, add few mL 20% NaCl soln. If any color moves down column at moderate rate, continue washing with 20% NaCl soln. If all color remains at or near top of column, change to 10% NaCl soln. If this soln fails to move any color down column, change to 5% NaCl soln. Continue lowering NaCl concn by half until concn is found which moves color down column at moderate rate.

Continue adding appropriate concn of NaCl soln until color is eluted and collected. If color seps into 2 or more bands as it progresses down column, collect each band sep. In some cases it may be necessary to change to still more dil. NaCl soln to elute upper bands of color. If ≥ 2 bands of color are found, examine each spectrophtric as in 930.38B(b). If this

Figura N°30. Método de la AOAC para la determinación de colorantes sintéticos en productos alimenticios.

column, wash with 50 mL pet ether and discard eluate. Add two 10 mL portions CHCl_3 . If CHCl_3 eluate is green or blue, add it to following alcohol- CHCl_3 eluate; if CHCl_3 eluate is colorless, discard it. Continue elution with alcohol- CHCl_3 (1 + 3) until eluate is colorless. Evap. solv. completely and dissolve residue in pet ether.

Carefully add soln to MgO column, dropwise at side of tube, with pipet. Apply slight pressure until soln just passes into adsorbent; then wash column with 25 mL pet ether, and discard pet ether wash. Elute with CHCl_3 and watch for colors, collecting sep. fractions. (First fraction may contain D&C Green No. 6 and Hexyl Blue. Second may contain Orange SS and Oil Red XO. Continue to colorless eluate and change receiver; then elute with alcohol- CHCl_3 (1 + 3), changing receivers as different colors appear (Oil Red OS, Yellows AB and OB, and D&C Red No. 17). Evap. individual solns, dissolve each in CHCl_3 , and scan from 350 to 700 nm. Compare curves with those from known colors. If curve for blue-green portion does not conform to known color, use following steps:

Evap. CHCl_3 and dissolve residue in *n*-hexane. Put on silicic acid column, and elute with *n*-hexane-benzene (1 + 1). Collect eluate until colorless and continue elution with benzene until eluate is colorless.

(If curve for D&C Red No. 17 has min. at 385 nm, Yellows AB and OB may be present. Sep. yellows from Red No. 17 as follows: Evap. CHCl_3 . Dissolve residue in min. vol. pet ether. Put on MgO column, and elute with alcohol- CHCl_3 (1 + 3). Collect sep. fractions as color changes.)

Det. color present by evap. solv. in fraction, dilg to vol. with CHCl_3 , and scanning from 350 to 700 nm. Compare curves with known color on same chart.

Ref.: JAOAC 49, 674(1966).

988.13 FD&C Color Additives in Foods Rapid Cleanup for Spectrophotometric and Thin Layer Chromatographic Identification First Action 1988

(Applicable to sep. and identification of FD&C Red Nos. 3 and 40, Blue Nos. 1 and 2, Yellow Nos. 5 and 6, Green No. 3, and former FD&C Red No. 2)

A. Principle

Color additives are sep. on reverse phase C_{18} cartridge and identified by spectrophotometry and thin layer chromatography.

B. Apparatus

(a) C_{18} cartridges.—Sep-Pak (Waters Associates, Inc.), or equiv. Cartridges are reusable when flushed with 3–4 mL 50% isopropanol to remove all residual coloring and stored in isopropanol until needed.

(b) Syringe.—10 mL, with Luer tip.

(c) Spectrophotometer.—UV-visible, recording, capable of scanning wavelength range from 750 to 350 nm.

(d) Spectrophotometric cells.—3.5 mL, 1 cm path length.

(e) TLC plates.—Silica gel G, precoated. Uniplates (Alltech Associates, Inc., 2051 Waukegan Rd., Deerfield, IL 60015), or equiv.

(f) Filter paper.—Folded, Whatman No. 2V, 12.5 cm, or equiv.

(g) Pipets.—Disposable, 5 μL . Microcaps (Drummond Scientific Co., 500 Parkway, PO Box 700, Broomall, PA 19008), or equiv.

C. Reagents

(a) Isopropanol solns.—2.5, 5, 13, 20, and 50% LC grade isopropanol in H_2O .

(b) Acetic acid soln.—1% HOAc in H_2O .

(c) Hydrochloric acid.—Concd, anal. reagent grade.

(d) NaOH soln.—50% NaOH in H_2O w/v.

(e) FD&C reference stds.—(Available from Food and Drug Administration, Division of Color Technology, 200 C St, SW, Washington, DC 20204, and commercial sources). Stock soln: 100 mg ref. std/100 mL H_2O . Working soln: Dil. 1 mL stock soln to 100 mL with appropriate isopropanol soln to obtain spectra. Use 1 cm cells as described in Identification.

(f) TLC solvent system.—*n*-Butanol-methyl ethyl ketone- NH_4OH - H_2O (5 + 3 + 1 + 1).

D. Preparation of Samples

Sample size depends on intensity of colorants present. Prior to C_{18} cartridge extn, filter samples thru prewetted paper, sintered glass filters, or disposable filters (Lid/X [Xydec Corp., Div. of Genex, 16020 Industrial Dr, Gaithersburg, MD 20877], or equiv.). Note: Filter paper may absorb coloring.

If lakes of colors are present use alternative methodology.

Following are examples of preps for commonly encountered samples.

(a) Oriental noodles.—Place 5 g product and 20 mL H_2O in beaker over low heat with gentle swirling until coloring is leached. Filter soln, and apply 2 mL filtrate onto cartridge.

(b) Candy.—Place in beaker 2 or more units depending on intensity of product coloring. Use sep. beaker for each different colored candy. Add 10 mL H_2O to each beaker and proceed as for noodles (a).

(c) Carbonated soda and similar drinks.—Use sample "as is." Apply 2 mL onto cartridge.

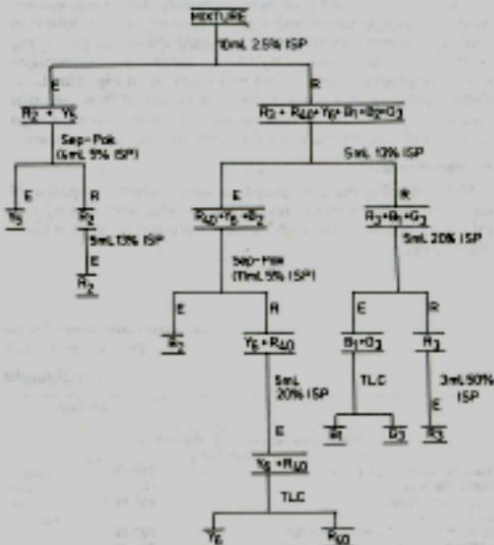


FIG. 988.13A—Scheme for identification of FD&C color additives: isopropanol (ISP); E = elutes and R = retains, R_2 , Red No. 2; R_3 , Red No. 3; R_{40} , Red No. 40; Y_5 , Yellow No. 5; Y_6 , Yellow No. 6; B_1 , Blue No. 1; B_2 , Blue No. 2; G_3 , Green No. 3

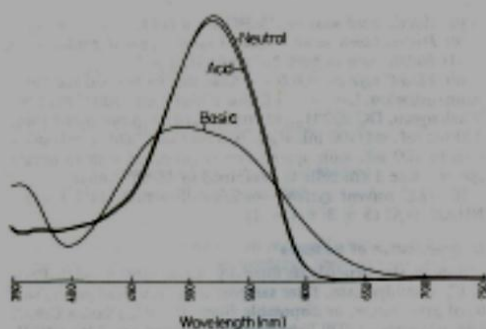


FIG. 988.13B—Spectra of former FD&C Red No. 2 in three 13% isopropanol solutions

(d) *Gelatin dessert*.—Place 3 g product and 90 mL H_2O in beaker over low heat with gentle swirling until dissolved. Filter soln and apply 5 mL filtrate onto cartridge. Use cartridge only once and discard. Use new cartridge for repeat extn.

(e) *Powdered drink mix*.—Place 1 g product in beaker, add 200 mL H_2O , and mix by gentle swirling until sample is dissolved. Filter soln and apply 2 mL filtrate onto cartridge.

(f) *Dye mixtures*.—Apply 1–2 mL aq. soln of dye mixt. directly onto cartridge.

E. Separation

Remove plunger from 10 mL syringe, and place long end of cartridge on Luer tip of syringe barrel. Add 3 mL isopropanol to syringe barrel and replace plunger. Pump soln thru cartridge, remove cartridge, and discard eluate. Repeat using 5 mL 1% HOAc followed by filtered sample and appropriate vol. of isopropanol soln according to scheme in Fig. 988.13A. Collect only colored portion. Elute at moderate flow rate that results in droplets rather than streams of eluant. Monitor sepd closely and discard fractions that contain overlapping bands.

F. Identification

Ref. std solns must be prep'd in same strength isopropanol used to elute test sample. Identify sepd color additives by visible spectrophotometry with further confirmation by thin layer chromatography.

(a) *Spectrophotometry*.—Use neut.-acid-basic combination spectra as shown in Fig. 988.13B. Perform following steps in sequence on same soln to obtain spectra under 3 conditions: (f) *Neutral soln*.—Fill 3.5 mL 1 cm absorption cell ca $3/4$ full with sample eluate and scan visible spectrum from 750 to 350 nm.

(2) *Acid soln*.—To neut. soln in cell add 1 drop (Pasteur pipet equiv.) of HCl. Obtain visible spectrum as for neut. soln. (3) *Basic soln*.—To acid soln in cell add 2 drops 50% NaOH soln. Obtain visible spectrum as for neut. soln.

(b) *Thin layer chromatography*.—Use silica gel G plates and TLC solv. system (f). Use sample eluate "as is" if color intensity is adequate for visualization, or conc. to small vol. if judged too dil'd. Streak 3 cm band of unknown sample along line 1 cm above base of TLC plate, and let dry. Apply 1 μ L appropriate ref. stds to plate at spaced intervals atop dried sample streak, dry, and develop to 10 cm. One common band that develops at R_f of corresponding ref. std identifies color additive.

Ref.: JAOAC 71, 458(1988).

920.209+ Natural Coloring Matters Identification by Color Reactions First Action Surplus 1970

See 34.017–34.029 and Table 34:2, 11th ed.

950.60 Analysis of Commercial Synthetic Organic Color Additives

A. Index to Methods for Certifiable Synthetic Organic Color Additives

Color Additive Amendment of 1960 to Federal Food, Drug, and Cosmetic Act provides for listing of color additives that are safe for use in foods, drugs, or cosmetics, and for certification of batches of those colors. "Code of Federal Regulations," Title 21, Part 74 provides listings of such color additives; provisionally listed colors are found in Part 81. Colors must be free from impurities to extent avoidable by good manufacturing practice. Color certification examines most batches for color content, subsidiary colors, intermediates, heavy metals, volatile matter, and inorg. salts.

Methods no longer used will be found in 9th, 10th, 11th, and 12th eds of *Official Methods of Analysis*. (See also Tables (e), (f), (g), and (h) below.)

(a) Determinations To Be Made on All Straight Colors Det. Pb as in 947.12, 948.24, or 948.25.

(b) Straight Colors—FD&C

Method		Method	
FD&C Blue No. 1 (CAS-2650-18-2) (Brilliant Blue PCP)		FD&C Blue No. 2 (CAS-660-22-0) (Indigotine)	
Volatile matter (135°)	993.86	Volatile matter (135°)	993.86
NaCl, Na ₂ SO ₄	(1)	H ₂ O-insol. matter	993.86
H ₂ O-insol. matter	993.86	NaCl, Na ₂ SO ₄	(1)
Leuco base	(2)	Subsidiary colors	(5)
<i>o</i> , <i>m</i> , and <i>p</i> -Sulfibenzazobenzohydroxide	967.20	Total color	950.61(c) & 955.390
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -(<i>m</i> -sulfobenzoyl)sulfanilic acid	967.20	Isatin-5-sulfonic acid	—
Subsidiary colors	(3)	Isomeric colors	—
Chromium	(4)	As	—
Total color	950.61(c) & 955.390		
As	—		

(Continued)

**950.63* Dye (Pure) in Color Additives
From Nitrogen Content
Final Action
Surplus 1970**

See 34.027-34.029, 11th ed.

**950.64* Dye (Pure) in Color Additives
From Sulfur Content
Surplus 1970**

**A. Fusion Method
—Final Action**

See 34.030, 11th ed.

**B. Perchloric Acid Digestion Method
—First Action**

See 34.031-34.032, 11th ed.

**950.69 Dye (Pure) in Color Additives
Spectrophotometric Method
Final Action 1960**

A. Apparatus

(a) *Spectrophotometer*.—Capable of accurate measurement of solns in region 400-750 nm; preferably with effective slit width of ≈ 10 nm.

(b) *Two or more matched absorption cells*.

B. Reagents

(a) *Std sample of dye to be determined*.—Std samples should be carefully prep'd and of highest attainable purity. Pure dye content of std samples must be accurately known for quant. results.

(b) *Solvents*.—Free from suspended matter.

C. Standardization

Prep. series of solns of known concns of std sample and det. $A (= \log (1/T))$ of solns, corrected for A due to solv. and cell, at suitable wavelength. (Wavelength at which A is max. is usually selected.) Adjust concns. of solns to give A values of 0.4-1.0 with instrument and cells used. Plot or tabulate data obtained.

D. Determination

Prep. sample soln in solv. used in stdn. (Soln must be of such concn that A obtained will be in range covered by stds examined.) Det. A of this soln under same conditions used in stdn.

Calc. "pure dye" content of sample from A of sample soln and A' of std soln:

$$\text{Pure dye} = (A/\text{concn sample})(\text{concn std}/A') \times \text{purity of std}$$

If straight line does not result when A' and concn data obtained from examination of std soln are plotted, *i.e.*, if Beer's law does not hold, det. concn of "unknown" soln by comparison with data obtained from known soln of very nearly same concn.

Refs.: JAOAC 27, 576(1955); 30, 522(1947); 31, 598, 674(1948); 32, 130, 635(1949).

**950.65 Volatile Matter in Color Additives
Gravimetric Method
Final Action**

Accurately weigh ca 2 g sample into tared weighing bottle ca 4 cm diam., and dry in air oven at temp. prescribed, 950.60A, 6 hr or overnight. Cool over efficient desiccant and reweigh. Report loss in wt as volatile matter.

950.66 Insoluble Matter in Color Additives

**A. Water-Insoluble Matter
—Final Action 1960**

Dissolve 2 g sample in 200 mL hot H₂O and let soln cool to room temp. Filter thru gooch, fitted with glass fiber disk, dried at 135°, and weighed. Wash with cold H₂O until washings are colorless, dry 3 hr at 135°, cool in desiccator, and weigh. Report increase in wt as H₂O-insol. matter.

**B. Carbon Tetrachloride-Insoluble Matter
—Final Action**

(Caution: See safety notes on toxic solvents and carbon tetrachloride.)

Mix 0.2-0.5 g sample with 100 mL CCl₄ in 250 mL beaker, stir, and heat to bp. Filter hot soln thru weighed gooch, transfer residue in beaker to filter, and wash with 10 mL portions CCl₄ until washings are colorless. Dry 3 hr at 100-105° and weigh. Report increase in wt as CCl₄-insol. matter.

**C. Toluene-Insoluble Matter
—Final Action 1960**

Proceed as in 950.66B, but substitute toluene for CCl₄.

**D. Benzene-Insoluble Matter
—Final Action 1960**

Proceed as in 950.66B, but substitute benzene for CCl₄.

**E. Acetone-Insoluble Matter
—First Action**

Proceed as in 950.66B, but substitute acetone for CCl₄.

**F. Alcohol-Insoluble Matter
—First Action**

Proceed as in 950.66B, but substitute alcohol for CCl₄.

**G. Carbon Tetrachloride-Insoluble Matter*
—First Action
—Surplus 1970**

See 34.046, 11th ed.

**H. Xylene-Insoluble Matter
—First Action**

Proceed as in 950.66B, but substitute xylene for CCl₄.

**I. Insoluble Matter (Alkaline Solution)
—First Action**

Proceed as in 950.66A, but use 1% NaOH soln or NH₄OH (1+14) instead of H₂O.

**950.67* Extracts of Color Additives
Surplus 1970**

**A. Isopropyl Ether Extract
—Final Action**

See 34.049, 11th ed.

ANEXO N° 8

**METODO PARA LA DETERMINACION DE COLORANTES SINTETICOS EN
PRODUCTOS ALIMENTICIOS ⁽²⁷⁾**

precipitates starch) containing 2% ammonia. The organic solvent should be removed before acidifying as in (c).

Extraction of the colour from the food:

Introduce about 20 cm length of woollen thread into a beaker containing about 35 ml of the prepared acidified solution of the sample and boil for a few minutes till the woollen thread is dyed. Take out the woollen thread and wash it with tap water.

Transfer the washed woolen thread to a small beaker containing dilute ammonia and heat again. If the colour is stripped by the alkali, the presence of an acid coal-tar dye is indicated. Remove the woollen thread. Make the liquid slightly acidic and boil with a fresh piece of woollen thread. Continue boiling until the colour is taken by the woollen thread. Extract the dye from the woolen thread again with a small volume of dilute ammonia, filter through a small plug of cotton and concentrate the filtrate over a hot water bath. This double stripping technique usually gives a pure colour extract.

Natural colours may also dye the wool during the first treatment, but the colour is not usually removed by ammonia. Basic dyes can be extracted by making the food alkaline, with ammonia, boiling with wool and then stripping with dilute acetic-acid. At present, all the permitted water soluble coal-tar dyes are acidic, hence an indication of the presence of a basic dye suggests that an unpermitted colour is present

Identification of the separated food colours by paper chromatography:

Draw a pencil-line parallel to the bottom edge of the paper (Whatman No.1) at about 2 cm distance. Spot the concentrated solution of the unknown dye on the line together with a series of spots (about 2 cm apart) of aqueous solutions of standard permitted dyes of similar colour and dry. Run the chromatogram, by ascending

technique, using a selected solvent. Solvent No.5 is often helpful for general purposes. Identify the colour in the sample by matching its spot with the spot of the standard colour and confirm by co spotting

Determination of Synthetic food colours in food products:

1. For samples containing single colour

- (a) **Preparation of standard curve: Stock solution:** Weigh 0.1 g m of each reference colour and dissolve in 0.1N HCl in separate 100 ml volumetric flasks and make up the volume with 0.1N HCl in each case.

Working standard: Pipette 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 and 1.5 ml of stock solution of each of the reference colours into series of clean and dry 100 ml volumetric flasks and dilute to volume with 0.1N HCl.

Determine the optical densities of each of the reference colours at the respective wave length of maximum absorption (refer table) Obtain the standard curve for each colour by plotting optical density against concentration.

- (b) **Determination in sample by column chromatography:** Transfer a known weight of the sample (approximately 5 - 10 gm) into a glass stoppered separatory funnel. Extract the colour with 70% acetone.

Shake acetone extract with petroleum ether (40-60°C) in order to remove carotenoids and other natural pigments, if any. Continue extraction with petroleum ether until petroleum ether extract is colourless. Pass the acetone extract containing only coal-tar food colours through a column (2.1 x 45 cm) containing aluminium oxide acidified with 1% HCl. Elute the adsorbed colour with 1% ammonia.

Evaporate the eluate to dryness on a hot waterbath, dissolve the residue with 0.1 N HCl, transfer quantitatively to a 100 ml volumetric flask and make up the volume with 0/1N HCl. Determine the optical density of the dye solution at the wavelength of maximum absorption.

Calculate the dye concentration from the standard curve.

TABLE SHOWING ABSORPTION MAXIMA OF PERMITTED FOUR COLOURS

Sl No	Name of Colour	Absorption maxima (nm)
1	Carmosine	516
2	Ponceau 4 R	507
3	Erythrosine	527
4	Green FCF	624
5	Indigo Carmine	609
6	Brilliant Blue FCF	630
7	Tartrazine	427
8	Sunset yellow FCF	482

2. For samples containing mixture of colours

(a) Paper Chromatography:

Extract the colours present in the samples and isolate as described under column chromatography. Make up the purified dye solution to a known volume with water (5 ml).

Spot an aliquot (approximately 0.5 to 1.0 ml) of the purified dye on Whatman No.1 filter paper as a band and develop the chromatogram using butanol : acetic acid: water (20:5:12) solvent system. After drying, cut out the coloured spots on the chromatogram and elute with 0.1 N HCl. Prepare a blank by cutting an equivalent strip from plain portions of the chromatogram and elute with 0.1 N HCl. Make up the eluate

to a known volume (100 ml) with 0.1 N HCl and determine the dye content as described under column chromatography.

(b) Thin Layer Chromatography:

Extract the colours present in the sample as described under column chromatography. Concentrate the eluate and make up to known volume with water (5 ml).

Preparation of TLC Plate:

To 50 gms of silica gel without binder add 50 ml of starch solution (0.6 gm of soluble starch dispersed in 100 ml of glass distilled water heated to boiling to gelatinise starch) and 50 ml of 1.25% solution of disodium salt of ethylene diamine tetra acetic acid, Mix the slurry well. Spread slurry using applicator on glass plates (20 · 20 cm) to thickness of 0.5 mm. Allow the plate to air dry and then dry at 120°C for two hours.

Spot an aliquot of the purified dye on TLC plate and develop the chromatogram using isoamyl : glacial acetic acid : water (40 : 20 : 20) solvent system. Remove the plate and dry. Scrape out the colour spots on the plate and transfer to test tubes. Elute the colour using 0.1N HCl. Prepare a blank by scraping from the plain portions of the plate. Make up the eluates to a known volume (100 ml) with 0.1N HCl. Determine the dye content as described under column chromatography.

(Ref:- Manual Methods of Analysis for Adulterants and Contaminants in Food, I.C.M.R 1990 Page 56)

ANEXO N° 9

**NORMA SALVADOREÑA OBLIGATORIA NSO 67.18.001:01 PRODUCTOS
ALIMENTICIOS. BEBIDAS NO CARBONATADAS SIN ALCOHOL.
ESPECIFICACIONES PARA COLORANTES ARTIFICIALES.**

PRODUCTOS ALIMENTICIOS. BEBIDAS NO CARBONATADAS SIN ALCOHOL. ESPECIFICACIONES.

CORRESPONDENCIA: Esta norma es una adaptación de la Norma COGUANOR NGO 34 215, 1993.

ICS 67.160.20

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Colonia Médica, Avenida Dr. Emilio Álvarez, Pasaje Dr. Guillermo Rodríguez Pacas, # 51, San Salvador, El Salvador, Centro América. Teléfonos: 226- 2800, 225- 6222; Fax. 225-6255; e-mail: info@ns.conacyt.gob.sv.

Derechos Reservados.

Se podrán utilizar los saborizantes naturales y/o artificiales indicados en las normas del Codex Alimentarius adoptadas como Normas Salvadoreñas Recomendadas, en cantidades adecuadas para lograr el efecto deseado en el producto.

6.4.2 Colorantes naturales.

El producto podrá ser adicionado en la cantidad adecuada para obtener el efecto deseado de los colorantes naturales indicados en el Tabla 4.

Tabla 4
Colorantes naturales

COLORANTES	
<ul style="list-style-type: none"> - Annato - Alfa, beta, gamma caroteno - Alfa, beta, gamma -8' carotenal - Beta - apo 8' carotenoide - Cacao - Cantaxantina - Caramelo - Carbón - Clorofila - Clorofila que contiene cobre 	<ul style="list-style-type: none"> - Clorofila que contiene cobre con sales de sodio y potasio - Cochinilla - Cúrcuma - Esteres metílico y etílico del ácido beta-apo 8' carotenoide - Remolacha - Riboflavina - Xantofila

6.4.3 Colorantes artificiales

Los colorantes artificiales podrán ser adicionados al producto de acuerdo a las especificaciones de la tabla 5:

Tabla 5
Colorantes artificiales

Colorante ¹⁾	Numeración del índice de color	Límites máximos, en mg/L
Azul brillante FCF (FD & Azul No. 1)	CI No. 42 090	100

Indigotina (FD & C Azul No. 2)	CI No. 73 015	200
Tartrazina (FD & C Amarillo No. 5)	CI No. 19 140	200
Amarillo crepúsculo FCF (FD & C Amarillo No. 6)	CI No. 15 985	200
Eritrosina (FD & C Rojo No. 3)	CI No. 45 430	200
Rojo allura (FD & C Rojo No. 40)	CI No. 16 035	200

- 1) La lista de colorantes artificiales permitidos puede ser modificada por las autoridades del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, en base a nuevos estudios toxicológicos. Los colorantes artificiales indicados no podrán emplearse en mezclas de más de 3 colorantes en el producto y la suma de las cantidades agregadas no podrá exceder de 200 mg/L, en el producto.

6.4.4 Acidificantes

Se podrán agregar acidificantes: ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido adípico, ácido málico y ácido fumárico, de acuerdo a buenas prácticas de manufactura, contemplado en el Codex Alimentarius.

6.4.5 Sustancias preservantes

Se podrá usar ácido benzoico, ácido sórbico y sus sales correspondientes de sodio o de potasio o mezclas de las misma, en una dosis máxima de 1.0 g/L, de acuerdo al as buenas prácticas de manufactura del Codex Alimentarius.

6.4.6 Otros aditivos alimentarios.

7 MUESTREO

7.1 PLAN DE MUESTREO

7.1.1 Plan de muestreo 1

El número de muestras que se deben tomar para efectuar los análisis, se indica en el Tabla 6.

Tabla 6
Número de unidades de muestreo

ANEXO N°10
ETIQUETAS DE BEBIDAS NO CARBONATADAS ANALIZADAS



A)



B)



C)

Figura N°31. Etiquetas de bebidas no carbonatadas analizadas: A) Jugo de la marca comercial: Del valle, B) Jugo de la marca comercial: Súper Juoó, C) Jugo de la marca comercial: Frutado

ANEXO N° 11

**ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR (ANOVA) PARA DETERMINAR SI
EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA CONCENTRACION DE
AMARILLO N° 5 Y N° 6 EN CADA UNA DE LAS BEBIDAS ANALIZADAS**

Súper Juoo Concentración mg/ 1000 mL Amarillo N°6			
	Extracción N°1	Extracción N°2	Extracción N°3
Aplicación N°1	1,03	1,05	1,03
Aplicación N°2	1,0	1,0	1,05
Aplicación N°3	1,0	1,02	1,0

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Súper Juoo concentración mg/1000 mL Amarillo N°6					
	3	3	3,03	1,01	0,0003
	3	3	3,07	1,023333333	0,000633333
	3	3	3,08	1,026666667	0,000633333

ANÁLISIS DE VARIANZA	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000466667	2	0,000233333	0,446808511	0,65934436	5,14325285
Dentro de los grupos	0,003133333	6	0,000522222			
Total	0,0036	8				

Figura N° 32. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) para la concentración de amarillo N°6 en la marca de bebida Super Juoo sabor naranja.

Jugos Frutado Concentración mg/ 1000 mL Amarillo N°6			
	Extracción N°1	Extracción N°2	Extracción N°3
Aplicación N°1	0,42	0,42	0,47
Aplicación N°2	0,45	0,45	0,44
Aplicación N°3	0,42	0,42	0,42

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Jugos Frutado concentración mg/ 1000mL de amarillo N°6	3	1,34	0,445666667	0,000233333
	3	1,29	0,43	0,0003
	3	1,33	0,443333333	0,000633333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000466667	2	0,000233333	0,6	0,578703704	5,14325285
Dentro de los grupos	0,002333333	6	0,000388889			
Total	0,0028	8				

Figura N° 33. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) para la concentración de amarillo N°6 en la marca de bebida Frutado sabor durazno.

Jugos Del Valle Concentración mg/ 1000 mL Amarillo N°6			
	Extracción N°1	Extracción N°2	Extracción N°3
Aplicación N°1	2,33	2,34	2,33
Aplicación N°2	2,39	2,38	2,36
Aplicación N°3	2,35	2,32	2,35

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Del valle concentración mg/ 1000 mL de amarillo N°6	3	7,07	2,356666667	0,000933333	
	3	7,04	2,346666667	0,000933333	
	3	7,04	2,346666667	0,000233333	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0002	2	0,0001	0,142857143	0,869740796	5,14325285
Dentro de los grupos	0,0042	6	0,0007			
Total	0,0044	8				

Figura N° 34. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) para la concentración de amarillo N°6 en la marca de bebida del Valle sabor mandarina.

Super Juoo Concentración mg/ 1000 mL Amarillo N°5			
	Extracción N°1	Extracción N°2	Extracción N°3
Aplicación N°1	0,2	0,19	0,19
Aplicación N°2	0,18	0,19	0,2
Aplicación N°3	0,18	0,18	0,19

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Super Juoo concentración mg/1000 mL Amarillo N°5	3	0,56	0,186666667	0,000133333
	3	0,56	0,186666667	3,33333E-05
	3	0,58	0,193333333	3,33333E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	8,88889E-05	2	4,44444E-05	0,666666667	0,54770849	5,14325285
Dentro de los grupos	0,0004	6	6,66667E-05			
Total	0,000488889	8				

Figura N° 35. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) para la concentración de amarillo N°5 en la marca de bebida Super Juoo sabor naranja.

ANEXO N° 12

DIAPOSITIVAS UTILIZADAS EN LA CHARLA EDUCATIVA

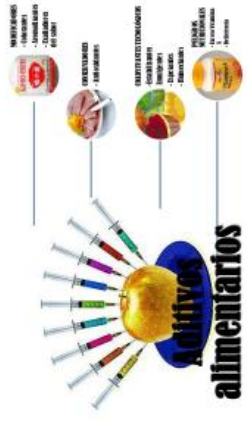

DETERMINACION DE AMARILLO N°5 Y N°6 EN BEBIDAS NO CARBONATADAS COMERCIALIZADAS EN EL CAMPUS CENTRAL DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. PRESENTADO POR: EDWIN ORLANDO CHAVEZ CRUZ ROLANDO DANIEL TORRES RIVERA



Introducción a los Aditivos Alimentarios

- La mayoría de alimentos que consumimos hoy en día contienen por lo menos algún aditivo alimentario que en muchos casos no aportan valor nutricional al producto final.
- Algunos pueden causar problemas a la salud del consumidor, sin que se sepa la causa del malestar, ya que los colorantes son agregados intencionalmente para mejorar las características de un producto.

Aditivos Alimentarios



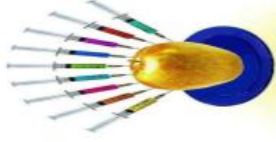
Colorantes

- Sustancias que aportan, intensifican o restauran el color de un producto para compensar la pérdida de color.
- El objetivo de usar colorantes en los alimentos es mejorar su aspecto visual y poder dar respuesta a las expectativas del consumidor.

Figura N° 36. Diapositivas utilizadas en la charla educativa.

Aditivos que modifican el color

Técnicamente los aditivos alimenticios que modifican el color son llamados colorantes.



Clasificación de los colorantes

- Colorantes naturales.
- Colorantes artificiales.



Colorantes artificiales

VENTAJAS

- Mayor poder tintóreo.
- Mayor estabilidad.
- Baratos y de fácil manipulación.

DESVENTAJAS

- Produce efectos en la salud como alergias, cáncer, hiperactividad y déficit de atención en niños.

Colorantes naturales

VENTAJAS

- No producen efectos en la salud.

DESVENTAJAS

- Carecen de fuerza tintórea.
- Aportan sabores no deseados al producto.

Figura N° 36. Continuación.

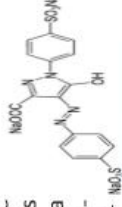
Colorantes artificiales utilizados en bebidas

Amarillo N°5 (Tartrazina)
Amarillo N°6 (Amarillo ocaso)



Amarillo N°5 (Tartrazina)

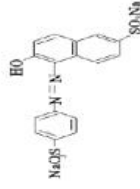
El aditivo colorante FD & C Amarillo N° 5 es principalmente la sal trisódica de 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfenil)-4-[4-sulfenil-azo]-1H-pirazol-3 carboxílico.



Se debe rotular de manera destacada en los alimentos que lo contienen, por su potencial toxicidad. Pertenecce al grupo de los colorantes azoicos, del tipo monoazo- (pirazolona).

Amarillo N°6 (Amarillo ocaso)

Amarillo ocaso aprobado por la FDA, es un colorante azo sulfonado, soluble en agua que se utiliza para el color de productos de panadería, cereales, bebidas, polvos de postre, dulces.



Hipersensibilidad

- En la década de 1970, se reportaron varios casos de sensibilidad a la tartrazina, con mayor frecuencia en la forma de urticaria y asma; pero también se incluyen.
 - Ola de calor
 - Debilidad general
 - Visión borrosa
 - Aumento de las secreciones nasofaríngeas
 - Sofocación
 - Paipitaciones
 - Prurito (picazón severa)
 - Angioedema (hinchazón o ronchas por debajo de la piel).
 - Una asociación entre intolerancia a la aspirina y sensibilidad a la tartrazina se ha demostrado en varios estudios



Figura N° 36. Continuación.

Implicaciones en la salud.

- En 1939 científicos japoneses constataron que un colorante sintético azoico utilizado frecuentemente provocaba cáncer en animales de experimentación lo que ocasiono la prohibición de todos los colorantes azoicos con fines alimentarios.
- También se ha documentado la aparición de reacciones alérgicas en personas asmáticas o que son sensibles al ácido acetilsalicílico las que peor toleran menos los colores azoicos.
- La tartrazina es el colorante que produce más reacciones alérgicas y se cree que deja residuos de sustancias cancerígenas de esta forma los alimentos que contengan este colorante deben llevar la advertencia "puede alterar la actividad y la atención en niños".

Colorantes artificiales permitidos en bebidas en El Salvador- Según la Normativa Salvadoreñas para aditivos alimentarios.

Colorante	Límites máximos, en mg/L
Azul brillante FCF (FD& Azul Nº.1)	100
Indigotina (FD & Azul Nº 2)	200
Tartrazina (FD & C Amarillo Nº 5)	200
Amarillo crepúsculo FCF (FD & C amarillo Nº 6)	200
Eritrosina (FD & C Rojo Nº 3)	200
Rojo allura (FD & C Rojo Nº 40)	200

Determinación de colorantes amarillo Nº5 y amarillo Nº 6 en las siguientes marcas de bebidas



Metodología utilizada.
Aislamiento del Colorante contenido en la bebida.

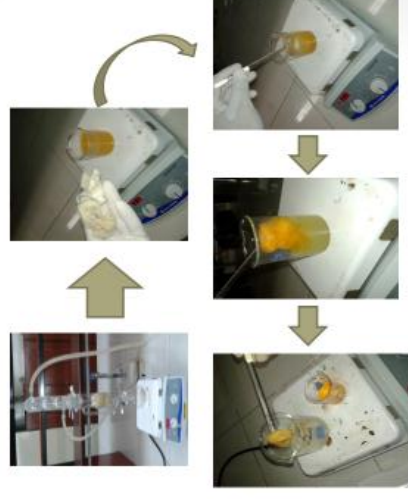


Figura N° 36. Continuación.

Aplicado en placa cromatográfica.



Determinación de Absorbancia



Metodología Utilizada Preparación de estándares.

Estándares .	
Volumen	Concentración
10.0 mL	0.25 mg/ mL
10.0 mL	0.50 mg/ mL
10.0 mL	0.75 mg/ mL
10.0 mL	1.00 mg/ mL
10.0 mL	1.25 mg/ mL
10.0 mL	1.50 mg/ mL



Resultados Obtenidos.

Marca comercial: Súper Juoó		
Submuestra	Colorante artificial: Amarillo N°5	
	Triplicado de la submuestra	Concentración de colorante en 1000mL
A	A ₁	1.03 mg
	A ₂	1.00 mg
	A ₃	1.00 mg
B	B ₁	1.05 mg
	B ₂	1.00 mg
	B ₃	1.01 mg
C	C ₁	1.00 mg
	C ₂	1.05 mg
	C ₃	1.00 mg
Promedio total		1.02 mg

Figura N° 36. Continuación.

Marca comercial	Colorante artificial	Concentración promedio mg/ 1000 mL
Súper Juoó	Amarillo N°5 FD y C	1.02 mg/ 100 mL
	Amarillo N°6FD y C	0.1901 mg/ 100 mL
Frutado	Amarillo N°5 FD y C	-----
	Amarillo N°6 FD y C	0.440 mg/ 100 mL
Del Valle	Amarillo N°5 FD y C	-----
	Amarillo N°6 FD y C	2.35 mg/ 100 mL

Marca comercial: Súper Juoó Sabor Durazno		
Colorante artificial: Amarillo N°6		
Submuestra	Triplicado de la submuestra	Concentración de colorante en 1000 mL
A	A ₁	0.462 mg
	A ₂	0.428 mg
	A ₃	0.450 mg
B	B ₁	0.420 mg
	B ₂	0.450 mg
	B ₃	0.420 mg
C	C ₁	0.473 mg
	C ₂	0.440 mg
	C ₃	0.420 mg
Promedio total		0.440 mg

Marca comercial: Del Valle sabor mandarina		
Colorante artificial: Amarillo N°6		
Submuestra	Triplicado de la submuestra	Concentración de colorante en 1000 mL
A	A ₁	2.33 mg
	A ₂	2.40 mg
	A ₃	2.36 mg
B	B ₁	2.34 mg
	B ₂	2.40 mg
	B ₃	2.32 mg
C	C ₁	2.33 mg
	C ₂	2.36 mg
	C ₃	2.35 mg
Promedio total		2.35 mg

Marca comercial: Súper Juoó Sabor Naranja		
Colorante artificial: Amarillo N°6		
Submuestra	Triplicado de la submuestra	Concentración de colorante en 1000mL
A	A ₁	0.2027 mg
	A ₂	0.1802 mg
	A ₃	0.1802 mg
B	B ₁	0.1914 mg
	B ₂	0.1914 mg
	B ₃	0.1802 mg
C	C ₁	0.1914 mg
	C ₂	0.2027 mg
	C ₃	0.1914 mg
Promedio total		0.1901 mg

Figura N° 36. Continuación.

Recomendaciones:

- Al momento de comprar un productor optar porque este contenga colorantes naturales y no artificiales.
- Realizar una evaluación cada uno de lo que comemos a diario y tratar de disminuir el consumo de productos que contiene en su composición mas de algun colorante artificial.
- Crear conciencia en la población sobre el daño que puede ocasionar el excesivo consumo de colorantes en los productos compartiendo la información con nuestros familiares, amigos y compañeros.
- Ampliar la investigación realizando mas investigaciones sobre los colorantes artificiales en diferentes productos que son mayormente consumidos por la población especialmente los niños.

MUCHAS GRACIAS POR LA
ATENCIÓN PRESTADA

PREGUNTAS???

DUDAS????



Figura N° 36. Continuación.

ANEXO Nº 13

**CALCULOS PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE AMARILLO
Nº5 Y Nº6 EN LAS TRES MARCAS DE BEBIDAS ANALIZADAS.**

Cálculos para conocer las concentraciones de amarillo N°5 y N°6 en las tres marcas de bebidas analizadas.

Primera prueba preliminar usando placas de sílica gel con base de vidrio.

Para el amarillo N°5 en la bebida con sabor a naranja de la marca Del Valle

$$\text{Concentracion} = \frac{110 \text{ nm} \cdot 0.008 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{281 \text{ nm}} * 50 = 0.1566 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

Así realizando la conversión.

Si en 100 mL ----- 0.1566 mg

1000 mL ----- X

X= 1.57 mg/ 1 litro de bebida

Y para una bebida de 500.0 mL

1.57 mg -----1000 mL

X -----500.0 mL

X= 0.94 mg de colorante amarillo N° 5 en una presentación de 500 mL de bebida

Marca y sabor.	Del Valle mandarina	Del Valle naranja
Contenido de colorante amarillo N° 5 (mg/ mL)	----	0.78 mg / 500 mL
Contenido de colorante amarillo N°6 (mg /mL)	1.65 mg / 500 mL	0.29 mg/ 500 mL
Total de colorante	1.65 mg / 500 mL	1.07 mg/ 500 mL

Segunda prueba preliminar utilizando placas de sílica gel con base de aluminio.

Calculando concentración final de la muestra de bebida no carbonatada de la marca comercial Del Valle con sabor a mandarina mediante la siguiente fórmula:

$$C Mx = \frac{(A Mx \times C std)}{A std} \times FD$$

$$C Mx = \frac{(0.185 \times 0.008 \text{ mg/mL})}{0.380} \times 50$$

$$C Mx = 0.19 \text{ mg/100 mL}$$

Así realizando la conversión para una bebida de 500 mL.

Si en 100 mL ----- 0.19mg

500.0 mL ----- X

X= 0.95 mg de colorante de amarillo N°6

Determinación de amarillo N° 5 y N° 6 en bebidas no carbonatadas.

Contenido de amarillo N° 5 en la marca comercial Super Juoó

$$C Mx = \frac{(0.065 \times 0.005 \text{ mg/mL})}{(0.155)} \times 50$$

$$C Mx = 0.10 \text{ mg/mL}$$

Así realizando la conversión para una bebida de 600 mL.

Si en 100 mL ----- 0.10mg

600.0 mL ----- X

X= 0.61 mg de amarillo N°5

Contenido de amarillo N°6 en la marca comercial Super Juoó

$$C Mx = \frac{(0.018 \times 0.005 \text{ mg/mL})}{(0.226)} \times 50$$

$$C Mx = 0.02 \text{ mg/mL}$$

Así realizando la conversión para una bebida de 600 mL.

Si en 100 mL ----- 0.02mg

600.0 mL ----- X

X= 0.12 mg de colorante de amarillo N°6

Contenido de colorante de amarillo N° 6 en la marca comercial Frutado

$$C Mx = \frac{(0.042 \times 0.005 \text{ mg/mL})}{(0.226)} \times 50$$

$$C Mx = 0.046 \text{ mg/mL}$$

Así realizando la conversión para una bebida de 500 mL.

Si en 100 mL ----- 0.046mg

500.0 mL ----- X

X= 0.23 mg/ 500 mL de bebida

Contenido de amarillo N° 6 en la marca comercial Del Valle

$$C Mx = \frac{(0.210 \times 0.005 \text{ mg/mL})}{(0.226)} \times 50$$

$$C Mx = 0.23 \text{ mg/mL}$$

Así realizando la conversión para una bebida de 500 mL.

Si en 100 mL ----- 0.23mg

500.0 mL ----- X

X= 1.15 mg de colorante amarillo N°6 en 500 mL de bebida

ANEXO N° 14

FOTOGRAFÍAS DE DIFERENTES ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN



A)



B)



C)



D)

Figura N°37. Primera etapa de la investigación: A) Desengrasado de lana cruda, B) Preparación de placas de silica gel con base de vidrio, C) y D) Preparación de estándares de amarillo N°5 y N°6.



A)



B)



C)



D)

Figura N°38. A) y B) adquisición de las muestras alrededor del Campus Central de la Universidad de El Salvador. C) y D) Realización del pool de muestras.



A)



B)



C)



D)



E)



F)

Figura N°39. A) y B) Extracción de colorantes. C) y D) Separación de colorantes y raspado de placas cromatográficas respectivamente. E) y F) Dilución de muestras y centrifugación de las mismas, respectivamente.



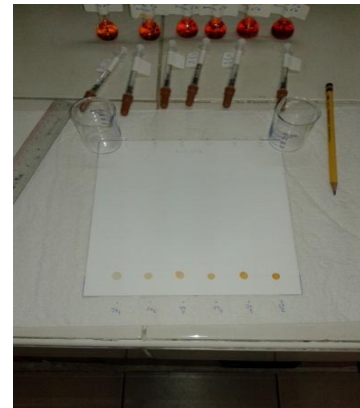
A)



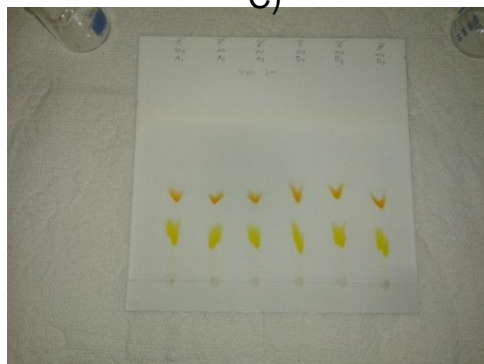
B)



C)



D)



E)



F)

Figura N°40. A) y B) Extracción de amarillo N° 5 y N° 6 de las bebidas por triplicado. C) y D) Aplicación de muestras en las placas de silica gel con base de aluminio. E) y F) Separación de los colorantes amarillo N°5 y N°6 y corrida de placas cromatográficas respectivamente.



A)



B)



C)



D)

Figura N°41. A) y B) Lectura de absorbancias de las muestras. C) y D) Placas cromatográficas cortadas y diluidas con agua para su respectiva lectura

ANEXO N° 15

**ESPECTROS DE IDENTIFICACION DE LOS COLORANTES AMARILLO N° 5
Y N° 6 EN LAS BEBIDAS NO CARBONATADAS ANALIZADAS**

Active Spectrum Graph Report

14/09/2015 03:23:33 p.m.

Data Set: File_150914_152232 - RawData

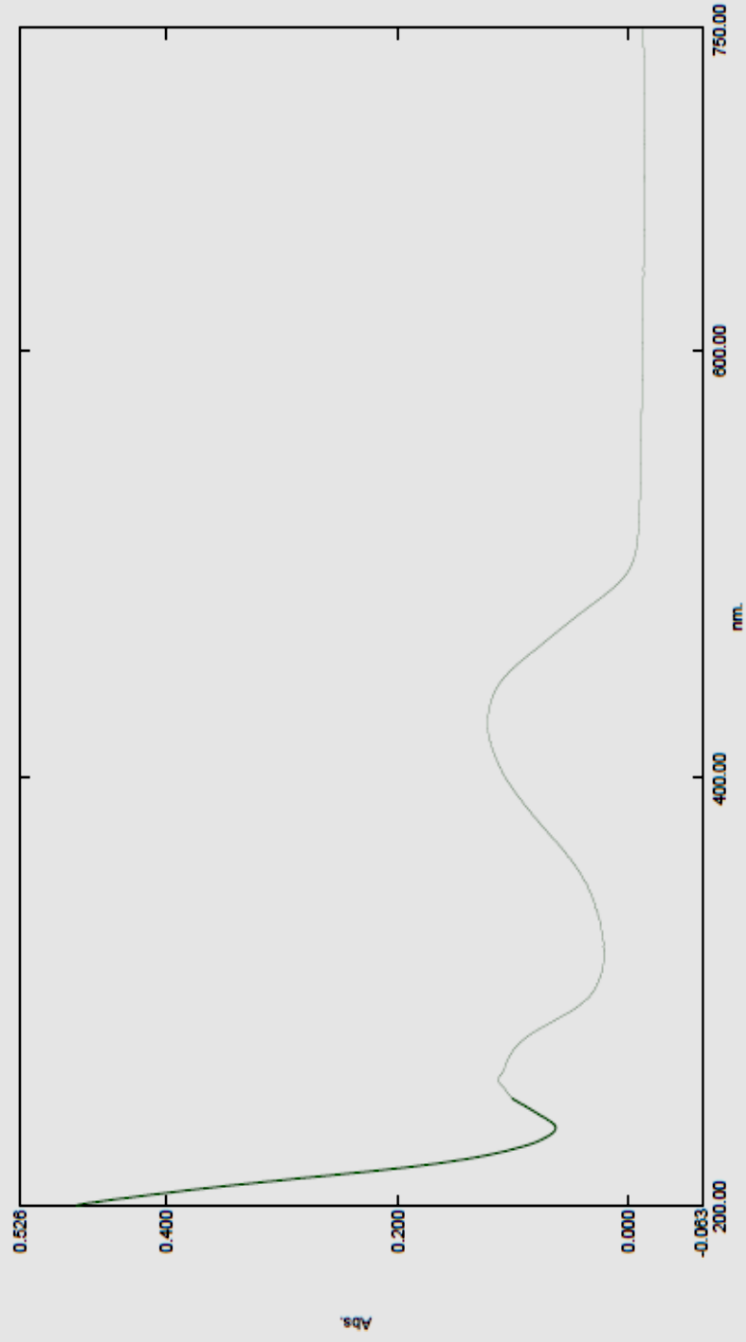


Figura N° 42. Espectro de identificación para el colorante amarillo N°5 de la marca comercial de bebida Súper Juoo sabor naranja

Active Spectrum Graph Report

14/09/2015 03:33:54 p.m.

Data Set: File_150914_153323 - RawData

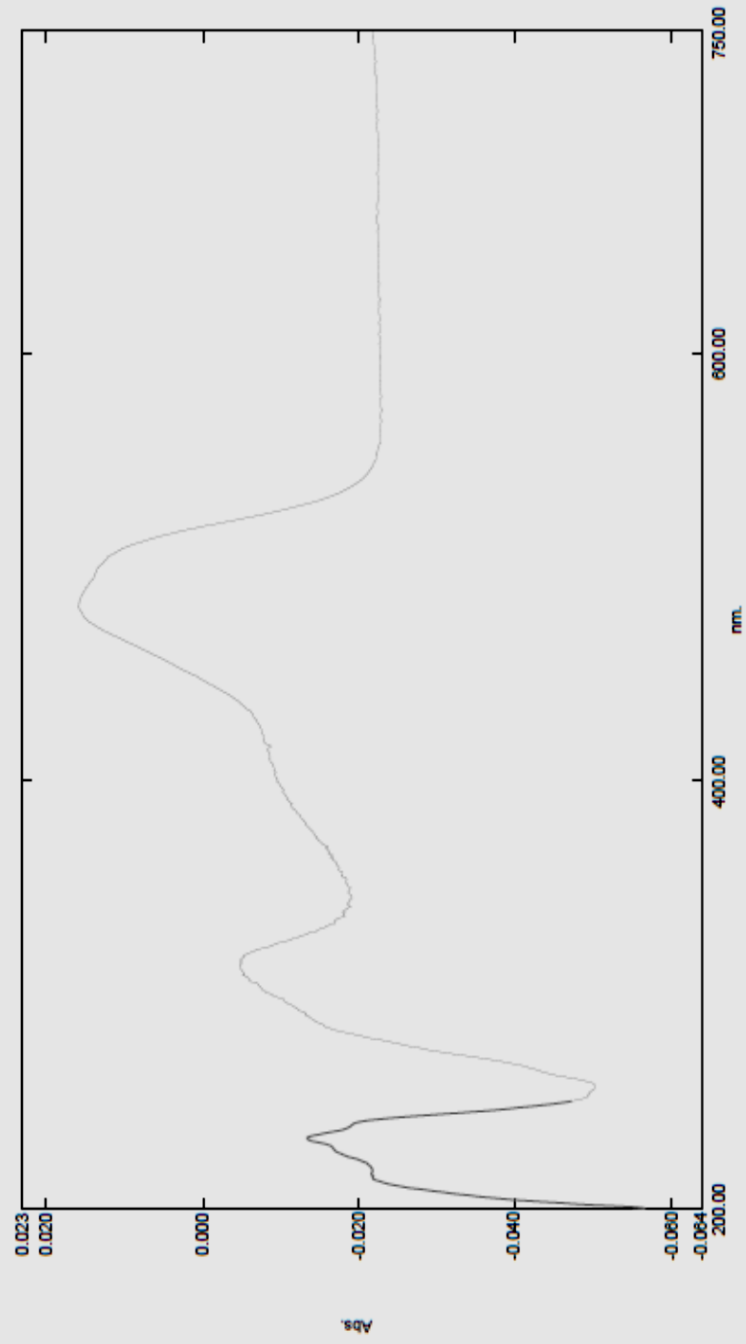


Figura Nº 43. Espectro de identificación para el colorante amarillo Nº6 de la marca comercial de bebida Frutado sabor Durazno.

Active Spectrum Graph Report

14/09/2015 03:11:28 p.m.

Data Set: File_150914_151055 - RawData



Figura Nº 44. Espectro de identificación para el colorante estándar amarillo Nº6.

Active Spectrum Graph Report

14/09/2015 03:37:52 p.m.

Data Set: File_150914_153720 - RawData



Figura N° 45. Espectro de identificación para el colorante amarillo N°6 de la marca comercial de bebida del Valle

Spectrum Peak Pick Report

14/09/2015 03:35:36 p.m.

Data Set: File_150914_152606 - RawData

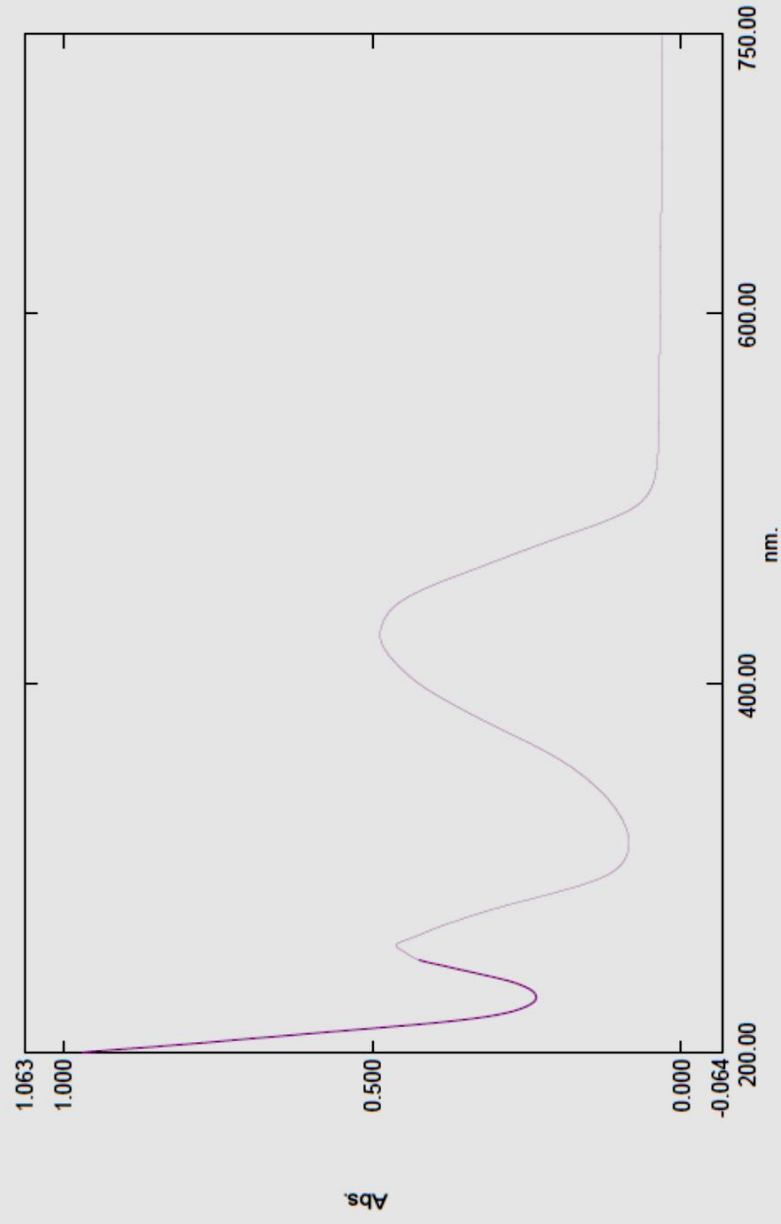


Figura N° 46. Espectro de identificación para el colorante estándar amarillo N°5.

Active Spectrum Graph Report

14/08/2015 03:08:58 p.m.

Data Set: File_150914_150702 - RawData

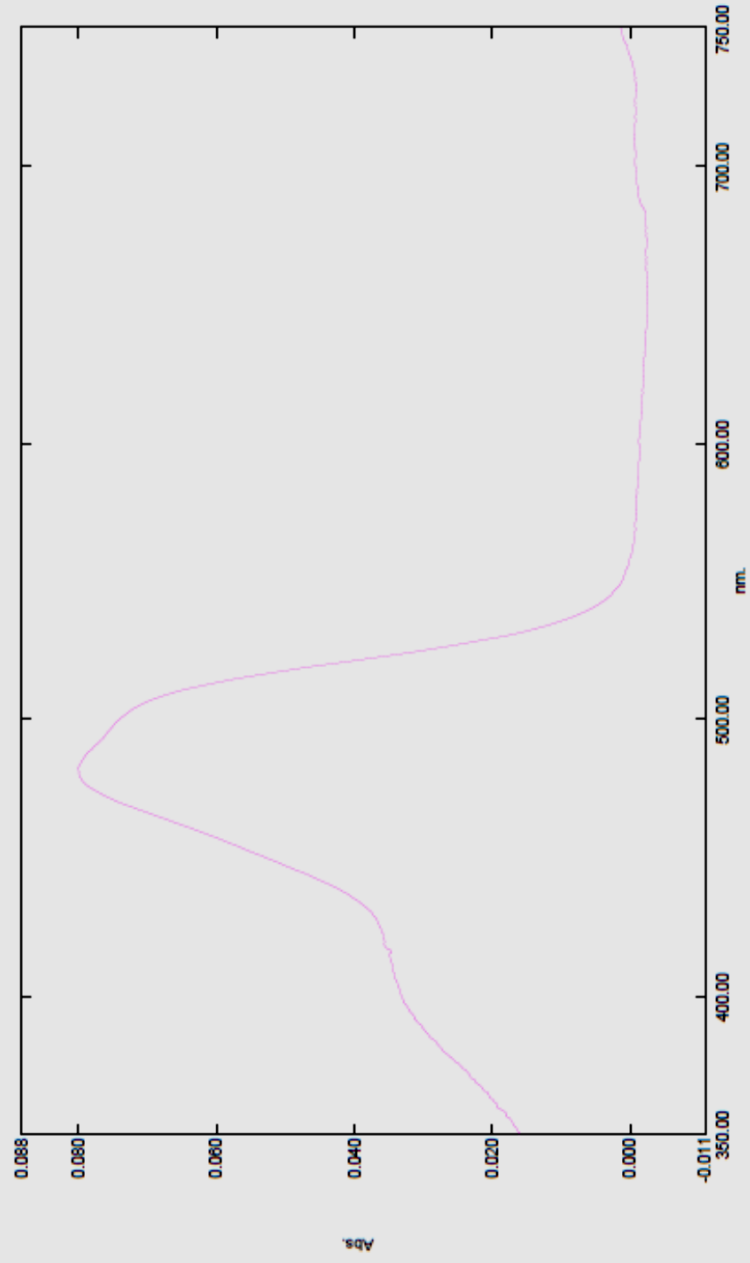


Figura N° 47. Espectro de identificación para el colorante amarillo N°6 de la marca comercial de bebida Súper Juoo.

ANEXO N° 16

FOTOGRAFÍAS DE LA CHARLA EDUCATIVA.



A)



B)



C)



D)



E)



F)

Figura N°48. A), B), C), D), E), y F): desarrollo de la charla educativa sobre los daños que provocan a la salud el consumo de colorantes artificiales amarillo N°5 y N°6, y los resultados obtenidos de la investigación en la optativa de Química Agrícola Aplicada IV de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

ANEXO N° 17

**CERTIFICADO DE ANALISIS DE PLACAS CROMATOGRAFICAS
PREFABRICADAS EN BASE DE ALUMINIO CON SILICA GEL F254**



Certificate of Analysis

1.05554.0001 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 25 Aluminium sheets 20 x 20 cm
Batch HX44246354

	Specifications		Batch values	
Specific surface area (according to BET; 5-PL measurement)	480 - 540	m ² /g	510	m ² /g
Pore volume (N ₂ -isotherm)	0.74 - 0.84	ml/g	0.79	ml/g
d 50 (laser diffraction, size distribution)	9.5 - 11.5	µm	10.3	µm
Layer thickness	175 - 225	µm	190	µm
Deviation of layer thickness per plate	≤ 30	µm	15	µm
	HRF-values		HRF-values	
A) Colour test				
Bleu Vif Organol	11 - 25		17	
Ceres black	34 - 48		38	
Ceres violet BRN	52 - 67		54	
Separation number	≥ 10.5		12.5	
	HRF-values		HRF-values	
B) Steroid test				
Hydrocortisone	25 - 37		27	
Reichstein S	37 - 49		39	
Methyltestosterone	42 - 54		46	

Typical value determined on a conditioned sheet
Eluent A) Toluene (45% rel.humidity)
Eluent B) Ethyl acetate/Toluene (95/5 v/v; 20% rel.humidity)

Date of release (DD.MM.YYYY) 19.11.2014
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.11.2024

Peter Schaub
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.