

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA
CUANTIFICACION DE COLORANTES ARTIFICIALES EN BEBIDAS NO
ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION
(HPLC)

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PRACTICA PROFESIONAL
SUPERVISADA

PRESENTADO POR

TANIA ODILIA VELASQUEZ CABRERA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

JULIO DE 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITEZ

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

MAESTRA ENA EDITH HERRERA SALAZAR

TRIBUNAL EVALUADOR

**ASESORES DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS**

PhD. GUADALUPE DEL CARMEN ABREGO ESCOBAR

LICDA. ARIANA LISSETTE GARCIA DE VENTURA

TUTORA

LICDA. CORINA IVETTE INTERIANO RAMIREZ

AGRADECIMIENTOS

Una vez culminada mi carrera agradecer a Dios en primer lugar por haberme guiado en este camino, por darme la salud, sabiduría y fortaleza necesaria para culminar con esta etapa de mi vida.

A mis padres Elsa Cabrera y Román Velásquez por apoyarme incondicionalmente, a mis abuelos Odilia Cruz y Porfirio Cabrera (QEPD) gracias por siempre creer en mí y motivarme a siempre dar lo mejor de mí, aunque las circunstancias sean difíciles, y a mi hermano Francisco gracias porque sin su ayuda no hubiera sido posible culminar mi carrera y este trabajo, gracias por darme ánimos y no permitir que me diera por vencida. Infinitas gracias por educarme, apoyar siempre mis proyectos y siempre estar ahí para mí cuando los necesito. También agradezco a mi familia que me ha apoyado en esta etapa de mi vida.

A las autoridades del Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Ministerio de Salud y Facultad de Química y Farmacia que hicieron posible el desarrollo de este proyecto en la modalidad de Práctica Profesional Supervisada, especialmente a la Licda. Celina Valle por su gestión y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A mis tutoras Licda. Cindy Martínez y Licda. Corina Interiano por su dedicación y esfuerzo para la realización de este trabajo, por compartir sus conocimientos y orientarme, por lo que les estoy muy agradecida.

A la dirección de procesos de grado M.Sc. Ena Herrera, tribunal evaluador PhD. Guadalupe Abrego y Licda. Ariana García, por sus observaciones y orientación en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos y compañeros que en algún momento aportaron su granito de arena para mi formación académica y me motivaron a seguir adelante hasta alcanzar el objetivo propuesto, les agradezco por recorrer este camino juntos cerrando una etapa en nuestras vidas que nos deja muchos recuerdos, les deseo muchas bendiciones y éxitos en su vida profesional.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todos aquellos que han sido parte integral de mi camino académico y personal.

A mis padres por su apoyo y amor incondicional todo este tiempo. Por su sacrificio y amor que han sido claves de mi éxito.

A mi hermano, que sin dudar ha estado dispuesto a apoyarme siempre, creyendo en mi sin importar las circunstancias.

A mis abuelos que han sido claves de mi éxito, gracias por las enseñanzas y todo el amor que me han brindado desde el principio.

A mis compañeros, gracias por todas las risas, estudio y conversaciones estimulantes a lo largo de la carrera, gracias por todos los momentos que compartimos juntos.

A mis profesores y tutores, gracias por toda la educación, enseñanza, dedicación y por guiarme en mi camino.

¡Infinitas gracias!

INDICE GENERAL

	Pág. N°
Introducción	x
Capitulo I. 1.0 Plan de Trabajo	14
Capitulo II. 2.0 Producto Final	41
Capitulo III. 3.0 Conclusiones	58
Capitulo IV. 4.0 Recomendaciones	60
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Organigrama Institucional del Ministerio de Salud	14
2. Organigrama de Laboratorio de Alimentos y Toxicología	16
3. Colorante Azul Brillante y su estructura química	27
4. Colorante Indigotina y su estructura química	28
5. Colorante Rojo Allura y su estructura química	29
6. Colorante Amaranto y su estructura química	30
7. Colorante Tartrazina y su estructura química	30
8. Colorante Amarillo Ocaso y su estructura química	31
9. Colorante Ponceau 4R y su estructura química	32

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Colorantes artificiales y concentraciones permitidas en bebidas no alcohólicas según RTCA 67.04.54:10.	26
2. Colorantes artificiales, sinónimos y características generales.	32
3. Resultado de investigación bibliográfica para desarrollo del método.	42
4. Resultados obtenidos en la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.	49
5. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Rojo N°2.	51
6. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Rojo N°40.	52

7. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Rojo 4R.	53
8. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Amarillo N°5.	54
9. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Amarillo N°6.	55
10. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Azul N°1.	56
11. Resultados para la evaluación de parámetros de desempeño de la metodología para colorante Azul N°2.	57

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°	Pág. N°
1. Herramientas de obtención de información para desarrollo del método.	65
2. Instrucción Técnica de Preparación de Muestras.	68
3. Instrucción Técnica de Preparación de Reactivos.	70
4. Instrucción Técnica de Operación de Equipo.	72
5. Hoja de Vida de Equipo.	74
6. Informe para entrega de resultados de la metodología.	76
7. Control de cambios y mejoras para la metodología cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.	78

8. Informe de resultados para evaluación de parámetros de desempeño de la metodología.	80
9. Cromatogramas obtenidos en la evaluación de parámetro de desempeño Selectividad/Especificidad de la metodología.	82
10. Cromatogramas obtenidos en la evaluación de parámetro de desempeño Selectividad/Especificidad de la metodología.	90
11. Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.	95

SIGLAS

LAT: Laboratorio de Alimentos y Toxicología

MINSAL: Ministerio de Salud

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

OSA: Organismo Salvadoreño de Acreditación

ISO: Organización Internacional de Estandarización

IEC: Comisión Electrotécnica Internacional

INTRODUCCIÓN

El RTCA 67.04.54:18 describe como bebidas no alcohólicas a todas aquellas que no presentan contenido alcohólico en su proceso de transformación o su proceso natural, entre los aditivos agregados a éstas para mejorar visualmente su aspecto y hacerlas más atractivas para su consumo están los colorantes artificiales, siendo los colorantes más utilizados Rojo N°40, 4R, Amarillo N°5, N°6 y Azul N°1, respecto a su uso existen límites para evitar complicaciones a la salud, a su vez el reglamento prohíbe la adición de los colorantes Rojo N°2 y Azul N°2 y se limita a una concentración de 50 mg/Kg para el Ponceau 4R.

Actualmente en el LAT se cuenta con el método de identificación de colorantes artificiales por cromatografía de papel, inicialmente se hace la extracción de los colorantes por medio de la metodología de Arata-Possetto que consiste en extraer el color en un medio ácido aplicando calor, el colorante se fija sobre las fibras de lana de oveja, posteriormente se limpia y se coloca en medio alcalino, al aplicar calor se desprende el color y se obtiene una solución coloreada, se extrae la lana y se deja evaporar casi a sequedad la solución coloreada, luego se procede a realizar la identificación por cromatografía líquida, se compara con los estándares respectivos para los colorantes.

Con la realización de este trabajo se busca dar respuesta a la necesidad de un método que permita cuantificar los colorantes artificiales en las bebidas no alcohólicas por medio de HPLC, la cromatografía líquida permite tener resultados eficaces y presenta la ventaja que se puede a su vez identificar y cuantificar los colorantes artificiales presentes en las bebidas y en caso de existir una mezcla de colorantes permite separar y cuantificar cada uno de ellos por separado.

Para el desarrollo del trabajo y del método se cuenta con herramientas bibliográficas entre algunos se encuentran reglamentos como el RTCA 67.04.54:18 que son un soporte muy importante para el desarrollo de la metodología, también características de interés de los colorantes artificiales que son el objetivo de análisis, para la recolección de datos se tienen formatos que sirven para organizar la información.

El trabajo fue desarrollado como Practica Profesional Supervisada como nueva modalidad de la Facultad de Química y Farmacia, para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia, esta modalidad tiene como objetivo conocer el rol del químico farmacéutico en el área laboral; también busca obtener experiencia y nuevos conocimientos para el estudiante en los diferentes procesos y actividades durante el análisis de alimentos. En las instalaciones del Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Ministerio de Salud, en la plataforma de análisis fisicoquímico de alimentos, el periodo de desarrollo fue de julio 2022 a enero 2023.

CAPITULO I
PLAN DE TRABAJO

1.1TITULO

La práctica profesional supervisada se desarrolló en la Plataforma de Análisis Fisicoquímico en las instalaciones del Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Ministerio de Salud, una dependencia del Instituto Nacional de Salud.

Desarrollo e implementación de un método analítico para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

1.2 DESCRIPCIÓN DE LA ENTIDAD / DEPARTAMENTO

El Ministerio de Salud de El Salvador es una institución estatal que tiene como objetivo principal coordinar y proveer la atención de la salud de los salvadoreños, es por ello que tiene bajo su dirección El Instituto Nacional de Salud (INS).

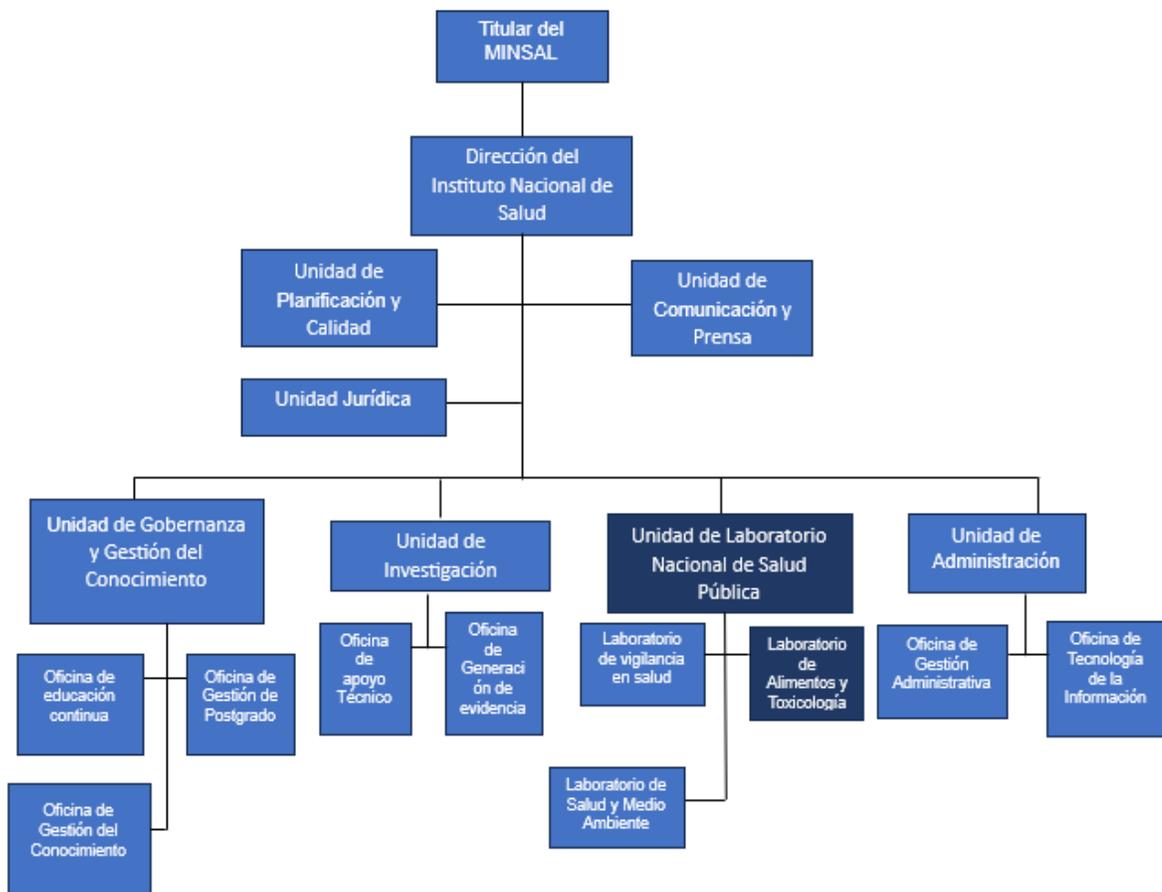


Figura N°1. Organigrama institucional del Ministerio. Elaboración propia

El Instituto Nacional de Salud (INS) tiene como fin generar, transmitir y difundir conocimientos científico-tecnológicos y promover su incorporación para la solución de los problemas de salud de la población. El INS surgió para convertirse en el referente nacional de investigación en salud, que brinda rectoría y gestiona condiciones científico técnicas para la indagación de las causas de las enfermedades y sus determinantes, para la producción de evidencia científica que permita la toma de decisiones, dirigidas a la solución de los problemas de

salud pública que amenazan a la población. Para tales fines el INS ha venido estableciendo coordinaciones con otras instituciones como universidades, organismos de cooperación internacional, servicios de salud, sector público y privado.

El INS está conformado por tres áreas prioritarias: Escuela de Gobierno en Salud, Departamento de Investigaciones en Salud y el Departamento de Laboratorios Especializados, siendo el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), más conocido como Laboratorio Nacional de Salud Pública, la máxima figura de este último componente.

Dentro de la estructura del Laboratorio Nacional de Salud Pública se encuentran tres dependencias: Laboratorio de Vigilancia en Salud, Laboratorio de Salud y Medio Ambiente y el Laboratorio de Alimentos y Toxicología (LAT), el cual cumple una función muy importante dentro de la sociedad salvadoreña, puesto que posee la responsabilidad de velar por la calidad de los alimentos e insumos alimenticios que se comercializan y consumen a nivel nacional.

El LAT tiene como objetivo brindar servicios de análisis Físicoquímicos, Microbiológicos y Toxicológicos de calidad, en muestras de alimentos, biológicas y ambientales utilizando métodos estandarizados, manteniendo al personal capacitado, actualizado y comprometido a trabajar bajo la Norma Técnica Salvadoreña NTS ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, para obtener resultados que garanticen la precisión, exactitud, integridad, trazabilidad, confidencialidad y satisfacción de sus clientes.

Los servicios que presta este laboratorio son para programas y funciones que desarrolla el Ministerio de Salud, entre ellos se encuentran:

- Vigilancia Microbiológicos, Físicoquímicos y Toxicológicos en Agua de Consumo Humano para dar cumplimiento al programa de la calidad del agua,
- Vigilancia de Vitamina A en azúcar, Hierro en Harina de maíz, trigo y pastas alimenticias, Yodo en Sal, para dar cumplimiento al programa de alimentos fortificados,
- Vigilancia de bebidas alcohólicas (Grado Alcohólico y Metanol)
- Vigilancia de Hielo
- Vigilancia de Agua envasada
- Vigilancia de Piscinas
- Vigilancia de Fórmulas Lácteas

- Intoxicaciones alimentarias
- Denuncias de alimentos
- Venta de servicios
- Licitaciones
- Tercería
- Registro Sanitario de Alimentos, Aguas y Bebidas Alcohólicas
- Vigilancia del Registro Sanitario
- Plomo en Sangre
- Colinesterasa en suero
- Metales en Suelo y sedimento,
- Estudios nutricionales, toxicológicos, etc.

La organización interna del laboratorio consiste en un equipo de 30 profesionales, organizados conforme al organigrama siguiente:

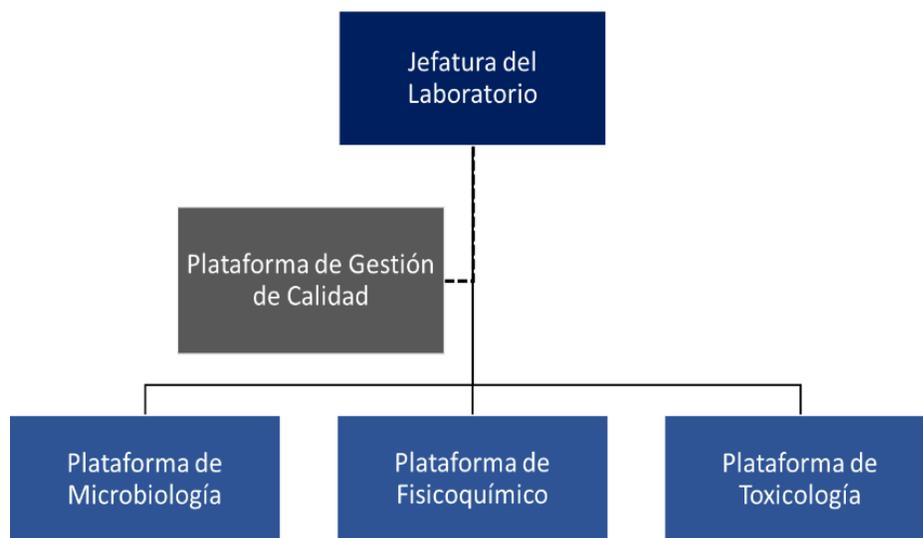


Figura N°2. Organigrama de Laboratorio de Alimentos y Toxicología.
Elaboración propia

El LAT del Ministerio de Salud se encuentra estructurado de manera administrativa bajo la jefatura del laboratorio y se divide organizadamente en plataformas donde se realizan las determinaciones de acuerdo a las disciplinas de los análisis; Plataforma de Físicoquímico, Plataforma de Toxicología,

Plataforma de Microbiología y la Plataforma de Gestión de Calidad; a su vez cada plataforma es dirigida por una coordinación.

La plataforma de análisis Físicoquímico de alimentos se encarga de diferentes análisis como determinación de colorantes artificiales, preservantes, cafeína, grasa, humedad, pH, determinación de yodo en sal, vitamina A en azúcar, entre otros análisis en alimentos y aguas de consumo humano.

El trabajo en conjunto de las diferentes plataformas permite mejorar la respuesta del laboratorio para sus análisis dando resultados confiables, desarrollados en el menor tiempo posible, permitiendo establecer una posición imparcial y confidencial dentro del margen legal que permita salvaguardar la calidad e inocuidad de los productos alimenticios que se comercializan diariamente en El Salvador y en consecuencia el bienestar de la población.

1.3 ANTECEDENTES

El Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Ministerio de Salud desde sus inicios en 1952 realiza la identificación de colorantes artificiales, dado que este es un parámetro de exigencia para su comercialización y consumo en El Salvador, a la fecha el LAT utiliza la metodología de Arata - Possetto para la identificación de los colorantes. En esta metodología se parte primeramente de una extracción alcalina y luego de tener el sustrato se identifica el colorante mediante Cromatografía de Papel. La Cromatografía en papel es útil para identificar los colorantes más comunes presentes en los alimentos, pero no es funcional para cuantificación, por esta razón surge la necesidad de desarrollar una metodología más robusta.

Por tal motivo, en la presente investigación se desarrolló un método que permita cuantificar colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas, con el fin de dar cumplimiento a la normativa vigente, descrita en el RTCA 67.04.54:18 Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. Los Colorantes de interés en el presente estudio son: Rojo N°2, N°40, Ponceau 4R, Amarillo N°5, N°6, Azul N°1 y N°2, ya que son los colorantes más comunes presentes en las bebidas no alcohólicas comercializadas, para el colorante Rojo 4R su cantidad máxima permitida es de 50 mg/kg y los colorantes Rojo N°2 y Azul N°2 no son contemplados como aditivos permitidos para esta categoría de alimentos.

La cromatografía por HPLC es una metodología completa y apta, que permite en un solo análisis determinar la presencia de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas, la identificación de uno o más colorantes presentes en la muestra y a su vez conocer la cantidad del aditivo, de esta manera se genera una respuesta a la problemática, se permite al LAT reportar sus análisis en términos de concentración de colorantes artificiales y presentar análisis más eficaces con un tiempo de respuesta corto, de esta manera se contribuye a salvaguardar la salud de los consumidores.

1.4 DESCRIPCION DE ACTIVIDADES Y FUNCIONES

En el siguiente cuadro se detallan las actividades y funciones realizadas durante el desarrollo de la Práctica Profesional Supervisada.

Cuadro N°1. Actividades y funciones desarrolladas. Elaboración propia

ACTIVIDADES	FUNCIONES
Lectura e inducción en el cuidado y manejo de equipos de análisis.	Conocer el espacio físico y apoyar en el desarrollo de los análisis del laboratorio.
Operar el equipo HPLC.	Apoyar el desarrollo experimental del método de análisis, apoyo en la secuencia y la implementación del mismo.
Apoyar en la preparación de reactivos requeridos para el desarrollo de la parte experimental.	Preparación de fase móvil, muestras y estándares.
Desarrollo del método de cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.	Apoyar en la parte experimental vinculada al desarrollo del método de cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.
Implementación del método para cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.	Apoyar en el proceso de implementación del método de cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

1.5 JUSTIFICACION

El trabajo propuesto busca mediante una metodología para cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC, dar respuesta a la necesidad existente de un método robusto en el LAT para la obtención de resultados confiables, rápidos y también, muy importante, conocer las concentraciones de colorantes artificiales, presentes en las bebidas no alcohólicas.

El consumo de colorantes artificiales en dosis excesivas puede ser causa de: reacciones alérgicas, hiperactividad en niños, tumores cancerígenos, migrañas, problemas hereditarios, entre otros. Razón por la que es de mucha importancia la existencia de un método analítico, que permita conocer la cantidad de colorantes presentes en bebidas no alcohólicas, de esta manera dar cumplimiento a los requisitos que exige el RTCA 67.04.54:18 y, en consecuencia, prevenir efectos no deseados en el consumidor.

El LAT no contaba con un método robusto que garantizara la cuantificación de los colorantes presentes en este tipo de bebidas, por tal razón, a fin de dar respuesta a la problemática y necesidad descrita, esta investigación se dedicó al desarrollo e implementación de un método analítico para cuantificar los colorantes artificiales, utilizando HPLC y para determinar la aptitud del método se evaluaron los parámetros siguientes: selectividad/especificidad, linealidad, precisión y exactitud.

Este trabajo de investigación se realizó a través de una práctica profesional supervisada en un periodo de 6 meses que comprendió desde el mes de julio de 2022 al mes de enero de 2023.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar e implementar un método analítico para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.6.2.1 Realizar una investigación bibliográfica orientada al desarrollo del método analítico para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

1.6.2.2 Redactar el procedimiento del método analítico para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

1.6.2.3 Evaluación de parámetros de desempeño del método analítico para cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

1.6.2.4 Implementar el procedimiento del método analítico de cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

1.6.2.5 Redactar el informe que contenga los resultados experimentales del desarrollo del método.

1.7 RESULTADO. PRODUCTO FINAL ESPERADO

El producto final obtenido de la práctica profesional supervisada fue el desarrollo del método analítico para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC, esto se evidencia a través de la redacción del método para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC, evaluación de algunos parámetros de desempeño y la implementación del mismo, también, la redacción de la Instrucción Técnica de Operación de Equipo, Instrucción Técnica de Preparación de Muestras, Instrucción Técnica de Preparación de Reactivos y La Hoja de Vida del Equipo.

El procedimiento de la metodología desarrollada se presenta en un documento que contiene las partes especificadas en el siguiente formato:

Laboratorio de Alimentos y Toxicología			
Determinación de Colorantes Artificiales en Bebidas no Alcohólicas por HPLC			Página 1 de -
Código: -- -- --		Fecha de emisión: -- -- ----	Cambio No: --
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	Versión No.

1. PROPOSITO

Descripción de los objetivos por los cuales se realiza el procedimiento.

2. ALCANCE

Colorantes Artificiales.

3. RESPONSABILIDADES

Autoridad o delegación de funciones dentro del proceso.

3. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Documentos utilizados para la elaboración del Procedimiento.

4. INTERFERENCIA Y LIMITACIONES

Interferencias y/o limitaciones que presenta el método.

5. TOMA Y PRESERVACION DE LA MUESTRA

Describe la forma de preservación de las muestras, condiciones especiales de almacenamiento, etc.

6. MATERIAL Y EQUIPO

Listar el material y equipo que se utilizó para el desarrollo experimental del método.

7. REACTIVOS

Listar los reactivos utilizados para el análisis.

8. PROCEDIMIENTO

Describe técnicamente la forma en la que se desarrolló el método propuesto.

9. CONDICIONES RECOMENDADAS

Condiciones óptimas del equipo para el análisis.

10. CALCULOS

Fórmulas o uso de software del equipo para obtención de los resultados.

11. INFORME DE RESULTADOS

Formato en el que se presentan los resultados.

12. CONTROL DE CALIDAD

Control de precisión y exactitud.

1.8 MARCO TEORICO

Los colorantes son añadidos a los alimentos por varias razones, por ejemplo, para recuperar el color perdido durante el procesamiento de los alimentos (luz, calor, acidez, etc.), para mejorar el color remanente después del procesamiento, para colorear el alimento de un color diferente al inicial y/o para minimizar diferencias entre lote y lote de producción. En muchos casos un buen proceso de coloreado puede llevar a condicionar si el producto gozará de éxito o será un rotundo fracaso comercial.

Por las razones antes mencionadas los colorantes artificiales son muy utilizados en las bebidas no alcohólicas, pero las cantidades adicionadas deben ser controladas para evitar efectos negativos en la salud de los consumidores, para este fin en el país se cuenta con El RTCA versión 67.04.54:18 Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios que indica los colorantes permitidos para estas bebidas y las cantidades máximas que pueden contener.

A continuación, se presenta detalladamente las subcategorías de las bebidas no alcohólicas, los colorantes artificiales más utilizados y los efectos secundarios relacionados a cada uno, las metodologías existentes para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas y algunos parámetros que se pueden tomar en cuenta para la evaluación de la aptitud del método.

1.8.1. Bebidas no alcohólicas

Se entiende por bebidas no alcohólicas, todas aquellas bebidas que no presentan contenido alcohólico en su proceso de transformación o su proceso natural. El RTCA, en su versión 67.04.54:18 Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios, cuenta con la categoría 14.1 para bebidas no alcohólicas, la cual comprende: aguas y aguas gaseosas, zumos (jugos) de frutas y hortalizas, néctares de frutas y hortalizas, bebidas a base de agua saborizadas con gas y sin gas y bebidas en infusión a base de agua como el café y el té.¹

1.8.2. Colorantes

Según la FDA, colorante o pigmento, es cualquier sustancia química obtenida por síntesis o artificio similar, extraída o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad, a partir de un vegetal, animal, mineral u otra fuente que imparte color a la comida, medicamentos o cosméticos, es decir, es capaz de impartir color por sí misma.

Los colorantes se pueden dividir en dos grandes grupos:

- Colorantes naturales
- Colorantes artificiales

Los colorantes naturales también son conocidos como pigmentos y los colorantes sintéticos como colorantes y lacas.

1.8.3. Uso de colorantes en alimentos

El uso de los colorantes en alimentos se basa en experiencias previas, por lo general los alimentos que consideramos óptimos para su consumo muestran colores que sugieren un buen sabor, el punto de madurez adecuado o si el producto se elaboró recientemente.²

Los colorantes naturales son considerados inocuos, lo que permite que se puedan usar indiscriminadamente y su uso depende principalmente de las buenas prácticas de manufactura.

Para el caso de los colorantes artificiales es diferente. Éstos requieren de una certificación en la cual estipulan especificaciones que se deben cumplir para poder utilizarlos con respecto a las cantidades y tipos de colorantes aptos para adicionar a los alimentos.³

Los colorantes que cuentan con certificación son los azoicos que representan un 31% de ventas mundiales. Con ellos se pueden generar casi todos los colores. Entre los más utilizados están el amarillo 5 (Tartrazina), amarillo 6 (Amarillo crepúsculo), rojo 2 (Amaranto), rojo 40 (Rojo allura), Azul 1 (Azul brillante), Azul 2 (Indigotina).⁴

Con el fin de permitir el libre comercio entre países, la unión europea ha asignado a los aditivos un número que puede ser de 3 a 4 cifras precedido de la letra E (Europa), para los colorantes se le asignó la E1. Tal nomenclatura permite reconocer de manera concisa a los colorantes, independientemente del idioma utilizado en la etiqueta.

Mientras que el Codex Alimentarius establece un sistema de nomenclatura para los aditivos alimentarios, conocido como Sistema de Numeración Internacional para Aditivos Alimentarios (INS), el que consiste con la asignación de tres o cuatro cifras opcionalmente seguidos por un sufijo alfabético para caracterizar

mejor algunos aditivos individuales, los números INS generalmente corresponden con los códigos E asignados por la Unión Europea.⁵

Antes de aprobar cualquier aditivo, se analizan los datos que existen en el consumo del colorante, de esta forma es posible definir una Ingesta Diaria Admisible (IDA) con un amplio margen de seguridad.

Las autoridades que marcan la línea normativa de uso en aditivos alimentarios, son la FDA (Food and Drug Administration) en EEUU y la EFSA (European Food Safety Authority) en la Unión Europea. Sin embargo, existen países que difieren con respecto a lo sugerido por estas organizaciones y al final cada país decide que aprobar o prohibir.⁶

Para El Salvador el uso de aditivos para color específicamente en bebidas no alcohólicas está basado en el RTCA 67.04.54:18 para Aditivos Alimentarios en Alimentos y Bebidas Procesadas, en el que establece los siguientes límites para la categoría 14.1:

Tabla N°1. Colorantes artificiales y concentraciones permitidas en bebidas no alcohólicas según RTCA 67.04.54:18.¹

Colorante	Concentración permitida según RTCA
Amaranto	No permitido
Amarillo ocaseo	BPM
Azul brillante	BPM
Rojo allura	BPM
Rojo Ponceau	50 mg/kg
Tartrazina.	BPM
índigo Carmín	No permitido

1.8.4. Características generales de colorantes sintéticos más utilizados en alimentos.

A continuación, se presentan los 7 colorantes sintéticos más utilizados en la industria alimenticia, en El Salvador, además de algunas características generales e información toxicológica (si existe).

Azul Brillante FCF (E133)

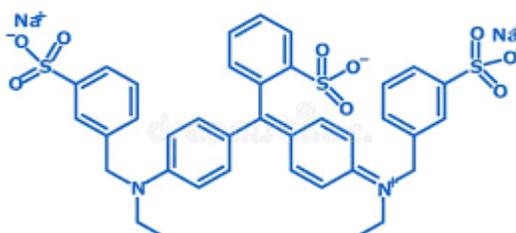


Figura N°3. Colorante Azul Brillante y su estructura química.⁴

Azul Brillante FCF conocido también como Azul 1, con número INS 133, es un colorante que se produce en dos grados: grado reactivo y grado alimenticio. El Azul Brillante FCF grado alimenticio tiene varios usos, entre los que se encuentran pasteles, confitería, comida para perros, bebidas, fármacos, repostería y helados. Desde que el Azul Brillante FCF ha sido utilizado como colorante en comidas se han reportado muchos estudios de su toxicidad. Todos indican que el colorante tiene una baja toxicidad crónica. Se estableció para la ingesta diaria de este colorante 12 mg por kg de peso. Se encontró también que peces, ratas y perros no bioacumulan este colorante por lo cual se concluye que no es genotóxico.

Sin embargo, el consumo en exceso de este colorante ha sido relacionado con reacciones alérgicas. Basados en estos resultados, la FDA lo incluyó como colorante permitido en comida, fármacos y cosméticos, excepto aquellas que se utilizan alrededor de los ojos (Registro Federal 1982, 1988).⁷

Indigotina B2 (E132)

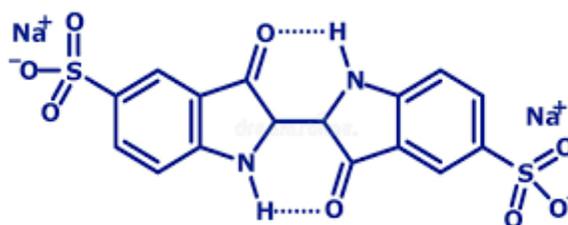


Figura N°4. Colorante Indigotina y su estructura química.⁴

El colorante Indigotina B2, Azul 2 o Carmín de Índigo, con número INS 132, es utilizado a nivel industrial en gomas de mascar, decoraciones y recubrimientos alimentarios, bebidas con aroma excepto leches de chocolate, y algunos vinos tintos.⁹

Con respecto a la toxicidad del colorante, en 2014 se llevó a cabo una reevaluación por parte de la EFSA. En dicho estudio concluyen que no se encontraron efectos nocivos respecto a la toxicidad crónica siempre y cuando éste contenga aproximadamente 93% de colorante puro y 7% de volátiles. El consumo en exceso se ha relacionado a hiperactividad y reacciones alérgicas.

Se considera que la cantidad permitida para ingesta diaria es de 5 mg por kg al día (para un material con la pureza antes mencionada).⁷

Rojo Allura AC (129)



Figura N°5. Colorante Rojo Allura y su estructura química.⁴

Al colorante Rojo Allura AC se le conoce también como Rojo 17 y Rojo 40, con número INS 129. Este colorante es generalmente usado en bebidas no alcohólicas aromatizadas, bebidas carbonatadas, vinos, suplementos alimenticios líquidos, yogures, flanes, algodones de azúcar, salsas, emulsiones aceite/agua, productos cárnicos, golosinas, mermeladas y pastelería.¹¹

En 2009 se realizó la reevaluación de este colorante por la EFSA, en la cual se concluye que la ingesta diaria aceptable es de 7 mg por kg al día. Sin embargo, en niños de 1 a 10 años la IDA puede ser de 1.2 a 8.5 mg por kg al día. Aun cuando se han reportado reacciones alérgicas como urticaria, asma y rinitis (la mayoría cuando se tomó el colorante Rojo Allura AC en combinación con otros colorantes).⁷

Amaranto (E123)

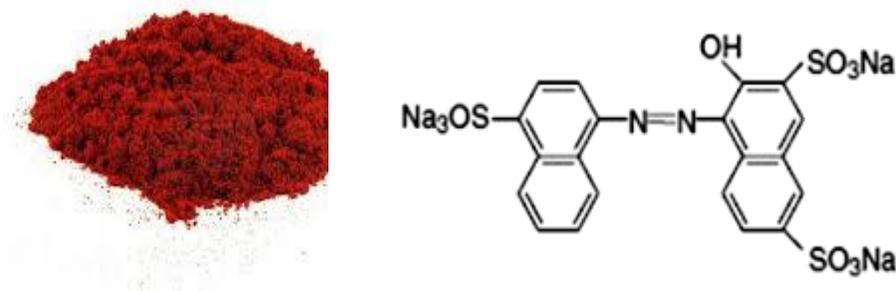


Figura N°6. Colorante Amaranto y su estructura química.⁴

Al colorante Amaranto también se le conoce como colorante Rojo 2, Rojo 9, Rojo Naftol S, Rojo Azo, Bordeaux S, Rojo Rápido y Rojo 27, con número INS 123. Se puede encontrar en polvo o gránulos color rojo a café oscuro. Este colorante es generalmente utilizado en vinos amargos, refrescos amargos, vinos de aperitivo incluidos los productos con menos de 15% de alcohol por volumen, huevos de pescado, helados, conservas, algunos alimentos enlatados y productos de confitería (de 0 a 20 mg/L y como máximo 25 a 30 mg/L).¹¹

Después de evaluar los estudios toxicológicos existentes con respecto al colorante Amaranto, la EFSA estableció una ingesta diaria aceptable de 0.15 mg por kg de peso corporal al día. Se estima que la exposición de niños de 1 a 14 años es 30 veces menor que la IDA. El consumo excesivo está relacionado con reacciones alérgicas e insomnio.⁷

Tartrazina (102)



Figura N°7. Colorante Tartrazina y su estructura química.⁴

La tartracina o tartrazina conocida también como Amarillo 5, con número INS 102, es un colorante artificial que pertenece a la familia de los colorantes azoicos, esto por contener el grupo azo en su estructura. La FDA la designa como Amarillo 5. La tartrazina puede ser encontrada en diferentes productos de repostería, helados, dulces, cereales de desayuno, gelatinas y bebidas tanto gaseosas como alcohólicas, energéticas e isotónicas. También se utilizan en productos farmacéuticos, cosméticos y comida para mascotas.¹¹

La FDA recomienda solo consumir 5 mg por kg de peso corporal por día, lo que significa una ingesta de 150 mg al día para un niño de 30 kilogramos de peso. Con resultados controversiales, se ha estipulado que la tartrazina puede ocasionar cambios en el comportamiento de los infantes generando una conducta hiperactiva.⁷

Amarillo Ocaso (E110)



Figura N°8. Colorante Amarillo Ocaso y su estructura química.⁴

Amarillo ocaso, conocido también como Amarillo 6, FD&C Amarillo 6, y Sunset yellow FCF, con número INS 110. El amarillo ocaso está presente en alimentos como mermeladas de albaricoque, galletas y productos de pastelería, sopas instantáneas, batidos de chocolate, harina para rebozar y margarinas.¹¹

La FDA recomienda solo consumir 4 mg por kg de peso corporal por día. En dosis bajas es un posible causante de hiperactividad en niños, en dosis altas es un liberador de histamina y puede aumentar los síntomas de asma, producir eczemas, urticaria e insomnio.⁷

Ponceau 4R (E124)

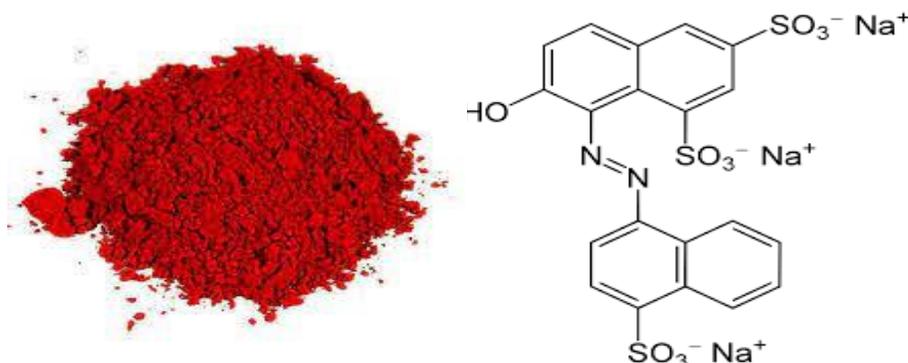


Figura N°9. Colorante Ponceau 4R y su estructura química.⁴

El colorante artificial Ponceau 4R (amapola en francés) con número INS 124 forma parte de los colorantes azoicos. Es utilizado principalmente para darle el color rojo a las mermeladas de fresa, salsas y al salami.¹¹

Hasta el momento no existen evidencias sobre efectos carcinogénicos o adversos en el ser humano. Sin embargo, puede generar reacciones alérgicas a las personas que son sensibles a la aspirina. Al igual que sucede con la Tartrazina y el Amarillo Crepúsculo, el Ponceau 4R ha sido señalado como posible causante del cambio en el comportamiento de niños con hiperactividad.⁷

A continuación, se muestra una tabla con características generales de los colorantes artificiales más comunes:

Tabla N°2. Colorantes artificiales, sinónimos y características generales.^{1,3,4,5}

Colorante	Nombre inglés	Sinónimo	Código CFR	Código UE	Número INS	Longitud de onda nm
Amaranto	Amaranth	Rojo 2	FD&C Rojo 2	E 123	123	520
Amarillo ocaso	Sunset yellow FCF	Amarillo 6	FD&C Amarillo 6	E 110	110	430-550
Azul brillante	Brilliant Blue FCF	Azul 1	FD&C Azul 1	E 133	133	630

Continuación Tabla N°2

Eritrosina	Erythrosine	Rojo 3	FD&C Rojo 3	E 127	127	525
Índigo carmin	Indigo carmine	Azul 2	FD&C Azul 2	E 132	132	610
Rojo allura	Allura Red AC	Rojo 40	FD&C Rojo 40	E 129	129	502
Rojo cochinilla	Ponceau 4R	Rojo 4R	–	E 124	124	505
Tartrazina	Tartrazine	Amarillo 5	FD&C Amarillo 5	E 102	102	428

1.8.5. Metodologías para la determinación de colorantes artificiales.

1.8.5.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina es rápida, poco costosa y un método eficiente de la simulación de la separación de muchos tipos de compuestos, es decir, es un análisis cualitativo.³

1.8.5.2. Electroforesis capilar

Usada en análisis para separar pequeñas y grandes moléculas en un tubo capilar que contiene una disolución buffer aplicando un campo eléctrico. El buffer de fosfato es el más utilizado en esta técnica, ya que es un buen separador de colorantes sintéticos. Es rápido y de bajo costo.³

1.8.5.3. Inmunoanálisis

Está basado en la unión de un anticuerpo al analito a analizar para identificarlo y cuantificar su concentración. Se ahorra tiempo, es más barato, además no requiere una limpieza de la muestra. Es una técnica sensible y específica, para pequeñas concentraciones de analito en muestras con matrices complejas que no requieren un pretratamiento. La enzima que se suele utilizar se denomina enzima-unidora inmunoabsorbente (ELISA), también se utilizan anticuerpos policlonales. Se usa en muestras de chile en polvo, chile o cerdo a la brasa.³

1.8.5.4. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS)

Consiste en una fase estacionaria no polar, C8 o C18. La fase móvil es polar. Hay dos modos de trabajo, en modo isocrático, si no varía la composición del eluyente, mientras que, en gradiente de elución, varía la composición del

eluyente, arrastrando así aquellos compuestos en función de su solubilidad en el eluyente. Se puede acoplar diferentes detectores, pero el más común es la espectroscopia de masas equipado con una interfase de ionización con electrospray y un analizador en tiempo de vuelo. Es un método robusto, reproducible y buen separador, proporcionando bajos resultados de límites de cuantificación y detección.³

1.8.6. Cromatografía

1.8.6.1. Definición

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.¹²

1.8.6.2. Fundamento

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.¹³

1.8.6.3. Descripción general de la cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una versión de la cromatografía, la cual es la técnica analítica más utilizada. Los procesos cromatográficos, en general, se pueden definir de la siguiente manera: La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una de ellas una fase estacionaria, mientras que otra se filtra a través de esta estacionaria.

El proceso cromatográfico ocurre como resultado de repetidos actos de adsorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria y la separación se debe a diferencias en los coeficientes de distribución de los componentes individuales de la muestra.

En la cromatografía de adsorción y fase reversa, es normal purgar con varios cientos de mililitros de metanol. La temperatura de la columna se puede utilizar a temperatura ambiente o elevada. Aunque la temperatura se puede usar para lograr o controlar el proceso de separación como se hace en la cromatografía de gases, esta no es la razón para usar temperaturas elevadas.

En cromatografía líquida se utiliza principalmente por cuatro motivos:

- Para reducir la viscosidad de la fase móvil a fin de lograr contrapresiones más bajas y aumentar la transferencia de masa.
- Para incrementar la solubilidad de la muestra en una fase ligada para obtener un sistema general más eficiente.
- Para aumentar las tasas de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico
- Para incrementar la solubilidad de la muestra en la fase móvil, en el orden que permita la introducción del tamaño adecuado de la muestra.

Usualmente las temperaturas suficientes para alcanzar estos objetivos son de 50-70 °C.

1.8.7. Análisis Cualitativo y Cuantitativo

El análisis cuantitativo se basa en valores de área de los picos cromatográficos. La respuesta del detector puede variar ampliamente, por lo tanto, la calibración adecuada y las condiciones para el análisis son muy importantes.

Se debe tener mucho cuidado para evitar interferencias (picos erróneos), cuya fuente generalmente se remonta a los recipientes o tubos de plástico con los que la muestra estuvo en contacto durante la recolección, preparación o almacenamiento.

Dichas interferencias pueden tener un efecto perjudicial en dos aspectos del análisis, cuando el tiempo de retención coincide con el de un compuesto de interés, es decir con el de un patrón interno. La primera situación producirá falsos

positivos y resultados inexactos, mientras que el último causará una cuantificación inexacta.

Otra fuente de interferencia pueden ser los componentes de análisis anteriores que permanecieron en el análisis para aumentar la fuerza del eluyente de la columna. Por lo tanto, a veces es útil utilizar un programa de gradiente para asegurarse de que la columna no retenga ningún componente de la muestra anterior.

1.8.8. Proceso de separación

Durante una corrida, las moléculas de la muestra son transportadas por la fase móvil a través del lecho de la fase estacionaria. Durante este viaje, las moléculas individuales de la muestra son retenidas por la fase estacionaria. Esta retención es selectiva lo que significa que, con un sistema de fase móvil/estacionaria dada, la cantidad de retardo será diferente para cada componente de la muestra.

El tiempo de retención de un soluto se puede dividir en dos partes, t_M (tiempo muerto) y t_R (tiempo de retención). Durante su paso por la columna, las moléculas de soluto pasan una parte de su tiempo en la fase móvil y la otra parte viajan con su velocidad, pero estando en la fase estacionaria.

Cuando se analiza una muestra multicomponente, cada componente de la muestra pasará el mismo tiempo en la fase móvil, pero asumiendo que están separados, cada uno pasará un tiempo diferente en la fase estacionaria. Esta es la razón para la separación.¹⁴

1.8.9. Evaluación de parámetros de desempeño

Para determinar la aptitud del método para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC es necesario realizar una evaluación de parámetros, éste se trata de un método no normalizado y para la comprobación de que el método cumple con las características necesarias para dar resultados confiables para el fin propuesto se evalúan algunos parámetros, basándose en la guía de validación para métodos fisicoquímicos G 9.6 versión 2 del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).¹⁵

A continuación, se presentan algunos parámetros tomados en cuenta para la evaluación del método:

1.8.9.1. Selectividad/Especificidad.

Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

Criterio de aceptación: Respuesta del método debida únicamente al analito.

1.8.9.2. Linealidad

Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.¹⁶

Criterio de aceptación: Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.

Coefficiente de correlación: $r \geq 0.98$

1.8.9.3. Exactitud

Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.¹⁶

Criterio de aceptación: valor de recuperación dentro del intervalo de trabajo 80-120 %

1.8.9.4. Precisión

Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.¹⁶

Criterio de aceptación: coeficiente de variación porcentual $< 10\%$ ¹⁵

1.9 DISEÑO METODOLOGICO

1.9.1. Tipo de estudio

Retrospectivo y prospectivo

- Retrospectivo: se hizo una investigación bibliográfica sobre los métodos analíticos aplicados al análisis de colorantes artificiales en alimentos.
- Prospectivo: el método desarrollado será implementado en el LAT.

1.9.2. Trabajo de campo

1.9.2.1. Universo: Las muestras que ingresan al LAT para análisis fisicoquímico.

1.9.2.2. Muestra: Las muestras de bebidas no alcohólicas que ingresan al LAT para análisis de colorantes artificiales.

1.9.2.3. Variables: Concentraciones de colorantes artificiales en las muestras de bebidas no alcohólicas.

1.9.2.4. Fuentes de información

- Primaria: datos obtenidos con base experimental en el LAT del Ministerio de Salud.
- Secundaria: estudio bibliográfico en libros, tesis, artículos de revistas y sitios web.

1.9.2.5. Técnicas de obtención de información

- Análisis documental: análisis externo como un soporte bibliográfico e interno, presentación de la información experimental.
- Observación no experimental: obtención de datos por medio de fuentes bibliográficas.
- Observación experimental: obtención de datos por medio de pruebas.
- Observación cualitativa: ensayo con un pequeño grupo de muestras para determinar presencia de colorantes artificiales.

- Observación cuantitativa: ensayo con un grupo de bebidas no alcohólicas para determinar presencia y concentración de colorantes artificiales.

1.9.2.6. Herramientas para obtención de información

Para la obtención de información se utilizan formatos para registros de peso de muestras y uso de equipos utilizados durante el desarrollo del método. (Ver Anexo N°1)

1.9.2.7. Procedimientos y análisis de información

El equipo HPLC, posee un software especial que permite calcular las curvas de calibración.

1.9.2.8. Pruebas o modelos estadísticos (Procesamiento y análisis de información)

- Desviación estándar: para determinar la dispersión de puntos de los datos.
- Ecuación de la recta: es una herramienta utilizada para determinar la pendiente.
- La pendiente: mide la inclinación o desviación de uno o varios puntos de la curva.
- Selectividad/especificidad: el método presenta una respuesta debida únicamente al analito.
- Linealidad: la gráfica concentración vs tiempo de retención presenta un comportamiento lineal.
- Exactitud: mide el grado de concordancia entre la proximidad de la medición con el valor de referencia aceptado.
- Precisión: en condiciones de repetibilidad.

CAPITULO II
PRODUCTO FINAL

Resultado de revisión bibliográfica para el desarrollo del método analítico para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

Se consultaron diferentes fuentes bibliográficas para conocer aspectos generales y específicos para cada colorante y facilitar cuantificación de los mismos.

Tabla 3. Resultado de investigación bibliográfica para desarrollo del método. ^{1,3,4,5}

Colorante	Sinónimo	Código UE	Longitud de onda nm	Tiempo de retención (minutos)	Concentración permitida según RTCA
Amaranto	Rojo 2	E 123	520	9.04	No permitido
Amarillo ocaso	Amarillo 6	E 110	430-550	11.40	BPM
Azul brillante	Azul 1	E 133	630	15.12	BPM
Índigo carmín	Azul 2	E 132	610	9.18	No permitido
Rojo allura	Rojo 40	E 129	502	12.79	BPM
Rojo cochinilla	Rojo 4R	E 124	505	10.15	50 mg/Kg
Tartrazina	Amarillo 5	E 102	428	7.68	BPM

Redacción del procedimiento para el método.

Se procede a la redacción del método para la cuantificación de colorantes artificiales, siguiendo el formato que a continuación se presenta:

Laboratorio de Alimentos y Toxicología			
Metodología de análisis para la cuantificación de Colorantes Artificiales en Bebidas no Alcohólicas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)			Página
Código:		Fecha de emisión: 00/00/2023	Cambio No.: 0
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	Versión No.: 0

1. PROPOSITO

El propósito de este método de análisis, es cuantificar la cantidad de colorantes artificiales contenido en muestras de bebidas no alcohólicas, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

La cromatografía Líquida es una técnica de separación de componentes en una muestra, esta separación se lleva a cabo gracias a la interacción de una fase móvil que transporta la muestra hasta una fase estacionaria que retiene el analito de interés, y dando como respuesta un pico cromatográfico en un tiempo específico para cada analito.

2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable para identificar y cuantificar colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas.

3. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- RTCA 67.04.54:18 Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios.
- Manual del Cromatógrafo Líquido de Alto Desempeño (HPLC).
- Practical Liquid Chromatography, An Introduction. Yost RW, Etre LS, Conlon RD. Perkin Elmer.
- HPLC for Food Analysis A Primer. Agilent Technologies. Gratzfeld A, Schuster R 1996. Pag 10-11.

4. INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES

- Usar reactivos grado HPLC.
- Utilizar agua ultra pura y filtrada.

5. TOMA Y PRESERVACION DE LA MUESTRA

La muestra debe estar en el envase que será comercializado, una vez abierto el envase se debe conservar en refrigeración a 4°C.

6. MATERIAL Y EQUIPO

- Guantes.
- Vial de vidrio
- Puntas de diferentes capacidades
- Pipetas volumétricas de diferentes capacidades
- Pipetas Pasteur de polipropileno tipo gotero
- Jeringas
- Micro espátulas
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 mL de capacidad
- Vasos de precipitados de diferente capacidad
- Balones volumétricos de diferente capacidad
- Reservorios de diferente capacidad
- Gradilla para viales
- Filtros de jeringa
- Membranas filtrantes
- Micropipeta de volumen variable
- Pipeteador
- Balanza Analítica
- Equipo de Filtración al vacío
- Bomba de filtración al vacío
- Baño de ultrasonido
- Equipo HPLC

7. REACTIVOS

Los reactivos que serán utilizados deberán prepararse de acuerdo a la Instrucción Técnica de Preparación de Reactivos

- Fase móvil

- Agua Ultrapura
- Metanol grado HPLC
- Colorante estándar Rojo N°2
- Colorante estándar Rojo N°40
- Colorante estándar Rojo 4R
- Colorante estándar Amarillo N°5
- Colorante estándar Amarillo N°6
- Colorante estándar Azul N°1
- Colorante estándar Azul N°2

8. CONDICIONES DEL EQUIPO

- Columna: C18
- Detector: Ultravioleta
- Longitud de onda:
 - Para colorantes Rojo N°2, N°40, 4R y Amarillo N° 5 y N°6: 465 nm
 - Para colorantes Azul N°1 y N°2: 620 nm
- Flujo de la bomba: 0.75 mL/min
- Duración de la corrida: 30 minutos
- Gradiente:
 - Metanol 3: Fase Móvil 97 durante 30 minutos

9. PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra

Las muestras deben prepararse según Instrucción Técnica de Preparación de Muestras. (Ver anexo No.2)

Preparación de estándares

Los estándares deben prepararse según Instrucción Técnica de Preparación de reactivos (Ver Anexo No.3) cumpliendo con las siguientes concentraciones:

- Preparar una serie de soluciones estándares de Amarillo N°5 a las siguientes concentraciones de: (40,80,120,160 y 200) mg/kg en agua ultrapura.
- Preparar una serie de soluciones estándares de Amarillo N°6 a las siguientes concentraciones de: (80,160,240,320 y 400) mg/kg en agua ultrapura.

- Preparar una serie de soluciones estándares de Rojo N°2 a las siguientes concentraciones de: (5,10,15,20 y 25) mg/kg en agua ultrapura.
- Preparar una serie de soluciones estándares de Rojo N°40 a las siguientes concentraciones de: (60,120,180,240 y 300) mg/kg en agua ultrapura.
- Preparar una serie de soluciones estándares de Rojo 4R a las siguientes concentraciones de: (10,20,30,40 y 50) mg/kg en agua ultrapura.
- Preparar una serie de soluciones estándares de Azul N°1 a las siguientes concentraciones de: (20,40,60,80 y 100) mg/kg en agua ultrapura.
- Preparar una serie de soluciones estándares de Azul N°2 a las siguientes concentraciones de: (60,120,180,240 y 300) mg/kg en agua ultrapura.

Análisis de las muestras

- Para análisis de colorantes Rojo N°2, N°3, N°40, 4R y Amarillo N°5 y N°6 seleccionar desde el disco “C” del computador conectado al equipo HPLC el método: **Cuantificación de colorantes Amarillos y Rojos** y para colorantes Azul N°1 y N°2 **Cuantificación de colorantes Azules**.
- Seleccionar desde el disco “C” del computador conectado al equipo HPLC el formato para reportes de resultados: Reporte Colorantes Artificiales.
- Seguir Instrucción Técnica de Operación de Equipo HPLC. (Ver Anexo No.4)

10.CALCULOS

El HPLC está equipado con un software (TcNav) especializado que realiza los cálculos de las concentraciones de los colorantes artificiales en las muestras por medio de operaciones matemáticas automatizadas.

11.INFORME DE RESULTADOS

Los resultados analíticos obtenidos de este análisis se reportarán en el formato de informe de Resultados. (Ver en Anexo No.6)

12.CONTROL DE CALIDAD

- **Control de la precisión**
Cada 20 muestras analizadas se coloca una réplica.
- **Control de exactitud**
Se coloca un control y este no debe exceder el 20% del valor especificado.

Evaluación de parámetros para determinar la aptitud del método.

El método para la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC, es un método no normalizado, por lo tanto, es necesario comprobar la aptitud para el análisis, en esta metodología se requiere un método selectivo, lineal, exacto y preciso.

Por esta razón, son parámetros tomados en cuenta como parte de la evaluación del método:

Selectividad/Especificidad.

Para evaluar este parámetro se colocaron en el equipo HPLC un blanco (agua ultrapura), un frente solvente (fase móvil) y estándares de los colorantes artificiales en estudio, cada uno de ellos por separado y se identifican a longitudes de onda de máxima absorción.

Luego se colocó una mezcla de colorantes para observar su interacción.

Criterio de aceptación: Respuesta del método debida únicamente al analito.

Linealidad

Para la evaluación de este parámetro se colocaron en el equipo HPLC mezclas de colorantes con diferentes concentraciones para establecer los valores de una curva de calibración.

Criterio de aceptación: Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.

Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98$

Exactitud

Se utiliza como referencia un blanco adicionado con nivel de concentración bajo, medio y alto.

El nivel bajo y alto se evalúa por triplicado y el nivel medio por sextuplicado.

Criterio de aceptación: valor de recuperación dentro del intervalo de trabajo 80-120 %

Precisión

Se realiza la lectura de un blanco fortificado con nivel de concentración bajo, medio y alto, se hacen lecturas por sextuplicado de cada nivel.

Criterio de aceptación: coeficiente de variación porcentual $< 10\%$ ¹⁵

Implementación del método: Cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

Para la implementación del método se realizó la cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas según su clasificación por subcategorías en RTCA 67.04.54:18.

Tabla N°4. Resultados de cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC. Elaboración propia

Subcategoría de bebida no alcohólica	N° Muestra	Colorante artificial identificado	Concentración de colorante artificial (mg/L)	Concentración de colorante artificial (mg/L) Replica
Aguas y aguas gaseosas	1	Rojo N°40	199.86	208.19
		Azul N°1	< 20	< 20
	2	Amarillo N°6	173.82	182.43
	3	ND	ND	ND
Zumos (jugos) de frutas y hortalizas	4	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND
	6	ND	ND	ND
Néctares de frutas y hortalizas	7	ND	ND	ND
	8	ND	ND	ND
	9	ND	ND	ND
Bebidas a base de agua saborizadas con gas y sin gas	10	Rojo N°40	9.62	10.28
	11	ND	ND	ND
	12	ND	ND	ND
Bebidas en infusión a base de agua como el café y el té.	13	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND
	15	ND	ND	ND

De acuerdo al RTCA 67.04.54:18 los colorantes Rojo N°40, Amarillo N°6 y Azul N°1 pueden utilizarse de acuerdo a BPM, por lo tanto, las bebidas N°1, N°2 y N°10 que presentan presencia de estos colorantes, cumplen con los criterios de aceptación.

Elaboración de informe de resultados de los datos experimentales obtenidos durante la evaluación de parámetros para determinación de aptitud del método.

Con los datos obtenidos en la evaluación de parámetros de desempeño del método se procede a elaborar el informe siguiente, de acuerdo al protocolo según (OSA) G 9.6 versión 2. (Ver en Anexo N°8)

Laboratorio de Alimentos y Toxicología		
Metodología para la Cuantificación de Colorantes Artificiales en bebidas no alcohólicas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).		
Pág.: ---		
Código del procedimiento:	Fecha de emisión:	Cambio No:
	Aprobado por:	Versión No:

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL ROJO N°2 EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 5. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Rojo N°2. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Rojo N°2, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Rojo N°2 presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9967	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	108.19	Cumple
Nivel bajo		107.88	
Nivel bajo		105.78	
Nivel medio		86.98	
Nivel medio		88.16	
Nivel medio		86.42	
Nivel medio		86.42	
Nivel medio		86.98	
Nivel medio		88.16	
Nivel alto		92.58	
Nivel alto		93.62	
Nivel alto		93.45	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	0.9684	Cumple
Nivel medio		1.2823	
Nivel alto		0.5361	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL ROJO N°40 EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 6. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Rojo N°40. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Rojo N°40, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Rojo N°40 presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9989	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	82.58	Cumple
Nivel bajo		83.30	
Nivel bajo		81.63	
Nivel medio		82.74	
Nivel medio		81.32	
Nivel medio		86.42	
Nivel medio		81.13	
Nivel medio		86.98	
Nivel medio		80.57	
Nivel alto		84.89	
Nivel alto		86.24	
Nivel alto		84.44	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	1.1174	Cumple
Nivel medio		1.4329	
Nivel alto		0.9117	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL ROJO 4R EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 7. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Rojo 4R. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Rojo 4R, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Rojo 4R presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coeficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9981	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	96.12	Cumple
Nivel bajo		95.20	
Nivel bajo		93.86	
Nivel medio		90.64	
Nivel medio		92.30	
Nivel medio		90.70	
Nivel medio		90.64	
Nivel medio		90.64	
Nivel medio		90.57	
Nivel alto		96.01	
Nivel alto		97.47	
Nivel alto		95.47	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	1.2390	Cumple
Nivel medio		1.2625	
Nivel alto		1.3448	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL AMARILLO N°5 EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 8. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Amarillo N°5. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Amarillo N°5, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Amarillo N°5 presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coeficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9990	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	86.26	Cumple
Nivel bajo		86.82	
Nivel bajo		84.59	
Nivel medio		84.25	
Nivel medio		85.80	
Nivel medio		84.29	
Nivel medio		85.80	
Nivel medio		85.80	
Nivel medio		86.64	
Nivel alto		87.56	
Nivel alto		88.80	
Nivel alto		87.06	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	1.2754	Cumple
Nivel medio		1.3123	
Nivel alto		1.0432	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL AMARILLO N°6 EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 9. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Amarillo N°6. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Amarillo N°6, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Amarillo N°6 presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coefficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9989	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	86.11	Cumple
Nivel bajo		86.65	
Nivel bajo		84.41	
Nivel medio		84.20	
Nivel medio		85.66	
Nivel medio		84.21	
Nivel medio		85.80	
Nivel medio		85.66	
Nivel medio		85.24	
Nivel alto		87.85	
Nivel alto		88.97	
Nivel alto		87.47	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	1.1174	Cumple
Nivel medio		0.9154	
Nivel alto		0.8534	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL AZUL N°1 EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 10. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Azul N°1. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Azul N°1, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Azul N°1 presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9989	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	95.83	Cumple
Nivel bajo		96.31	
Nivel bajo		98.19	
Nivel medio		94.33	
Nivel medio		97.54	
Nivel medio		97.54	
Nivel medio		95.88	
Nivel medio		97.54	
Nivel medio		95.88	
Nivel alto		94.40	
Nivel alto		98.48	
Nivel alto		97.89	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	2.3753	Cumple
Nivel medio		2.0594	
Nivel alto		2.0820	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

EVALUACION DE PARAMETROS PARA CUANTIFICACION DEL COLORANTE ARTIFICIAL AZUL N°2 EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 11. Resultados de Evaluación de Parámetros de Desempeño para Colorante Azul N°2. Elaboración propia

PARAMETRO EVALUADO	LIMITE	RESULTADOS OBTENIDOS	OBSERVACION
Selectividad/Especificidad	El equipo presenta una señal única debido al analito	El colorante Azul N°2, presenta una señal al minuto	Cumple
Linealidad	Comportamiento lineal en la gráfica concentración vs respuesta analítica	La gráfica concentración vs respuesta analítica para el colorante Azul N°2 presenta comportamiento lineal	Cumple
Intervalo de Trabajo			
Coefficiente de determinación	$r \geq 0.98$	0.9998	Cumple
Recuperación, Exactitud (tanto por uno)			
Nivel bajo	80%-120%	91.73	Cumple
Nivel bajo		95.37	
Nivel bajo		106.16	
Nivel medio		98.96	
Nivel medio		100.58	
Nivel medio		97.78	
Nivel medio		101.13	
Nivel medio		100.59	
Nivel medio		101.69	
Nivel alto		96.51	
Nivel alto		100.40	
Nivel alto		98.81	
Precisión intermedia como CV			
Nivel bajo	CV \leq 10 %	2.2684	Cumple
Nivel medio		1.3082	
Nivel alto		1.2589	

Observación: Se cumplen los requisitos de calidad requeridos, por lo que el método puede ser utilizado para los propósitos establecidos.

CAPITULO III
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La experiencia adquirida en el programa de la Práctica Profesional Supervisada fue muy enriquecedora para el desarrollo profesional personal ya que se permite la incorporación a un equipo de trabajo donde se permite llevar a la práctica los conocimientos adquiridos a lo largo de la formación académica.
2. Con el desarrollo e implementación del método de cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC, se contribuye a salvaguardar la salud de los consumidores, asegurando la calidad de los productos analizados con la metodología.
3. Con los resultados obtenidos de la cuantificación de colorantes artificiales, en bebidas no alcohólicas, tomando en cuenta cada subcategoría para el grupo 14.1 del RTCA 67.04.54:18, se evidencia el cumplimiento del mismo en cada bebida analizada.
4. De acuerdo a los parámetros evaluados: Selectividad/especificidad, linealidad, exactitud y precisión en condiciones de repetibilidad, se evidencia que el método propuesto es apto para la aplicabilidad en cuanto a la cuantificación de colorantes artificiales.

CAPITULO IV
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a los egresados que optan por la Práctica Profesional Supervisada como proceso de graduación, cumplir con lo establecido en el reglamento de Práctica Profesional Supervisada, para que las instituciones brinden más oportunidades de aprendizaje a futuras generaciones.
2. Es necesario que la Universidad de El Salvador realice más convenios con diferentes instituciones para beneficiar a más estudiantes que deseen optar por esta modalidad.
3. Al analista se recomienda utilizar reactivos grado HPLC para evitar interferencias.
4. Al usuario del equipo se recomienda desgasificar las muestras gaseosas, por medio de agitación previo a ser filtradas y colocadas en el equipo para análisis para evitar interferencias o señales erróneas en el cromatograma.

BIBLIOGRAFIA

1. Reglamento Técnico Centroamericano. Anexo de la Resolución No. 283-2012 (Comieco-LXIII). Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. p. 45. RTCA :18
2. Owen R. Fennema. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. United States of America, 1996, 651.
3. Mena A. Determinación de colorantes alimentarios sintéticos en alimentos mediante HPLC/MS. Tesis de Grado en Química. Universidad de Jaden. 2019. p. 36-87.
4. Analiza Calidad [Internet]. Complejo Naves; Departamento Físico-químico, Bromatológico y Nutricional [citado 09-Sep-2022]. Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi192col.pdf>.
5. Carmona I. REPORTE N° 5. Agrimundo; 2013.
6. Aberoumand A, World J. Dairy & Food Sci. 2001. p. 6-71.
7. Belmonte J, Arroyo I, Vázquez M, Cabrera E. Colorantes Artificiales en Alimentos. 2016. p. 36-124.
8. Aguilar F, Domenico A, Mortensen A. State United of America. EFSA Journal; 2014. p. 12,3768.
9. Boylan A, Deimel W, Hennighausen J. The Artificial Colors in Food. 2010. p. 27-36
10. Aguilar F, Dusemund B. Blue Brilliant in Effect of Mouses. Woutersen. EFSA Journal; 2009. p. 7, 1327.
11. Chávez E, Torres R. Determinación de Amarillo N°5 y N°6 en bebidas no carbonatas comercializadas en el campus central de la Universidad de El Salvador. Tesis de grado. Universidad de El Salvador. 2016. p. 51-52.
12. <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 03/11/2022.

13. Reglamento Técnico Centroamericano. Anexo de la Resolución No. 283-2012 (Comieco-LXIII). Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. p. 45.
14. Owen R. Fennema. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. United States of America, 1996, p. 651.
15. Organismo Salvadoreño de Acreditación. Validación de métodos analíticos fisicoquímicos. Versión 2. 2017. p. 1-28.
16. Eurachem. La adecuación al uso de los métodos analíticos. Primera edición española. 2014. p. 19,30.

ANEXOS

Anexo No.1
Herramientas de obtención de información para el desarrollo de la metodología de Cuantificación de colorantes artificiales en bebidas no alcohólicas por HPLC.

Formato para registro de peso de muestra.

<p>LABORATORIO</p> <p>REGISTRO DE ANALISIS DE COLORANTES EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR HPLC</p> <p align="right">FORMATO</p>							
Año:							
FECHA	# DE MUESTRA	PESO DE MUESTRA	FIRMA	FECHA	# DE MUESTRA	PESO DE MUESTRA	FIRMA

Formato para registro de uso de equipo (balanza).

<p>LABORATORIO</p> <p>FORMULARIO DE USO DE EQUIPO</p>					
<p>Equipo: Balanza</p> <p>Modelo: -- --</p> <p>Código: -- --</p>					FORMATO
FECHA	T°	HORA INICIO	HORA FINAL	OBSERVACION	RESPONSABLE

Formato para registro de uso de equipo (pHmetro).

LABORATORIO FORMULARIO DE USO DE EQUIPO					
Equipo: pHmetro Modelo: -- Código: --					FORMATO
FECHA	T°	HORA INICIO	HORA FINAL	OBSERVACION	RESPONSABLE

Formato para registro de uso de equipo (HPLC).

LABORATORIO FORMULARIO DE USO DE EQUIPO					
Equipo: HPLC Modelo: -- Código: --					FORMATO
FECHA	T°	HORA INICIO	HORA FINAL	OBSERVACION	RESPONSABLE

Anexo No.2
Instrucción de Preparación de Muestras.

Instrucción Técnica de Preparación de Muestras

MATERIAL Y EQUIPO

- Jeringas
- Filtros para jeringas de 0.22 μm
- Beaker de 10 mL
- Beaker de 25 mL
- Viales de vidrio de 2 mL

PROCEDIMIENTO

- Homogenizar la muestra y colocar aproximadamente 5 mL en un beaker.
- Filtrar con una jeringa y filtro para jeringa.
- Colocar la muestra filtrada en un vial de vidrio de 2 mL

Anexo No.3
Instrucción de Preparación de Reactivos.

Instrucción Técnica de Preparación de Reactivos

- **Fase móvil 1% (v/v) de ácido acético en agua para análisis de colorantes artificiales.**

Medir 1 mL de ácido acético glacial y aforar en un balón de 1 L, medir el pH de la solución y ajustar hasta un valor de 4.

Filtrar al vacío, utilizando un filtro de membrana de 0.45 µm. Desgasificar la solución en un baño de ultrasonido por 15 minutos.

- **Curva de calibración para colorantes Rojo N°2, N°40, 4R y Amarillo N°5, N°6 y Azul N°1 y N°2**

Preparar soluciones Stock de los colorantes.

A partir de las soluciones Stock preparar los niveles de la curva de calibración para cada colorante.

Tabla N°4. Detalle de la concentración de cada nivel para la curva de calibración de cada colorante. Elaboración propia

Colorante	Nivel				
	1 (ppm)	2 (ppm)	3 (ppm)	4 (ppm)	5 (ppm)
Rojo N°2	5	10	15	20	25
Rojo N°40	60	120	180	240	300
Rojo 4R	10	20	30	40	50
Amarillo N°5	40	80	120	160	200
Amarillo N°6	80	160	240	320	400
Azul N°1	20	40	60	80	100
Azul N°2	60	120	180	240	300

Anexo No.4
Instrucción Técnica de Operación de Equipos.

Laboratorio de Alimentos y Toxicología		
Instrucción Técnica de Operación y Calibración de Equipos		Página
Código:	Fecha de emisión:	Cambio No: Versión No:

OPERACIÓN DE CROMATÓGRAFO LIQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN CODIGO A-01

- Encender el detector, la bomba, horno, el automuestreador y data handing system.
- Abrir el icono **NAV** en la computadora.
- Dar clic en el botón **Run** y seleccionar Take control.
- Purgar el equipo de manera manual.
- Seleccionar el método.
- Programar la secuencia para el análisis.
- Seleccionar desde la pestaña "Actions" la opción "Set up" para cargar la secuencia.
- Acondicionar la columna.
- Desde la pestaña "Detector" seleccionar "AutoZero"
- Encender el horno, establecer la temperatura de 40°C.
- Seleccionar icono **Run** desde el menú principal, luego seleccionar "Start Run" para iniciar el análisis.
- Al finalizar, realizar el lavado de la columna según indica el método, desde el icono **Hands On**.
- Apagar el horno.
- Cerrar el programa en la computadora.
- Apagar el detector, la bomba, horno, automuestreador y data handing system.

Anexo No.5
Hoja de Vida de Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC).

HOJA DE VIDA DE EQUIPOS	
FECHA DE ELABORACIÓN	ENERO 2023

DETALLE	CARACTERÍSTICAS
NOMBRE DEL EQUIPO	Cromatógrafo
CODIGO	A-01
SERIE	-----
FECHA DE ADQUISICIÓN	-----
VERSIÓN DEL SOFTWARE	S/I
FECHAS DE LA CALIBRACIÓN	N/A
FECHA DE LA PROXIMA CALIBRACIÓN	N/A
INTERVALO DE CALIBRACIÓN	VER PROGRAMA DE CALIBRACION
CARACTERÍSTICAS Y COMPONENTES DEL EQUIPO	Consta de 6 módulos que consisten en: 1- Reservorios con desgasificador, 2- Bomba, 3- Detector, 4-Horno y columna, 5-Auto muestreador y 6-Procesamiento de datos. Además, cuenta con una computadora equipada con una impresora.
REQUISITOS E INDICACIONES DADAS POR EL FABRICANTE	Dar mantenimiento preventivo periódicamente.
MANTENIMIENTO INDICADO POR EL FABRICANTE	Limpieza externa con un paño seco absorbente.
CALIBRACIÓN (TIPO Y PERIODICIDAD)	Se encuentra en garantía
PERSONAL RESPONSABLE DEL EQUIPO	LIC. F. _____
PERSONAL AUTORIZADO PARA USO DE EQUIPO	LIC. F. _____

Anexo No.6
Formato Para Informe de Resultados de la Metodología.

Nombre del cliente:
Dirección del cliente:
Motivo:
Nombre del producto:
Lote:
Fecha de vencimiento:
Solicitud:
Fecha de ingreso:
Fecha de reporte:
Fecha de emisión del informe:

Determinación	Referencia bibliográfica	Resultado	Fecha de análisis
Colorantes artificiales			

Coordinadora de plataforma
Fisicoquímico

Jefa de Laboratorio de
Alimentos y Toxicología

Anexo No.7
Control de Cambios y Mejoras Para la Metodología de Cuantificación
de Colorantes Artificiales en Bebidas No Alcohólicas por HPLC.

Tabla N°5. Control de cambios y mejoras del procedimiento.

Hoja De Control De Cambios y Mejoras				
Cambio	Versión	Sección y/o pagina	Descripción de la modificación y mejora	Fecha de modificación
0	0	Todo el doc.	Creación de procedimiento analítico	15/01/2023

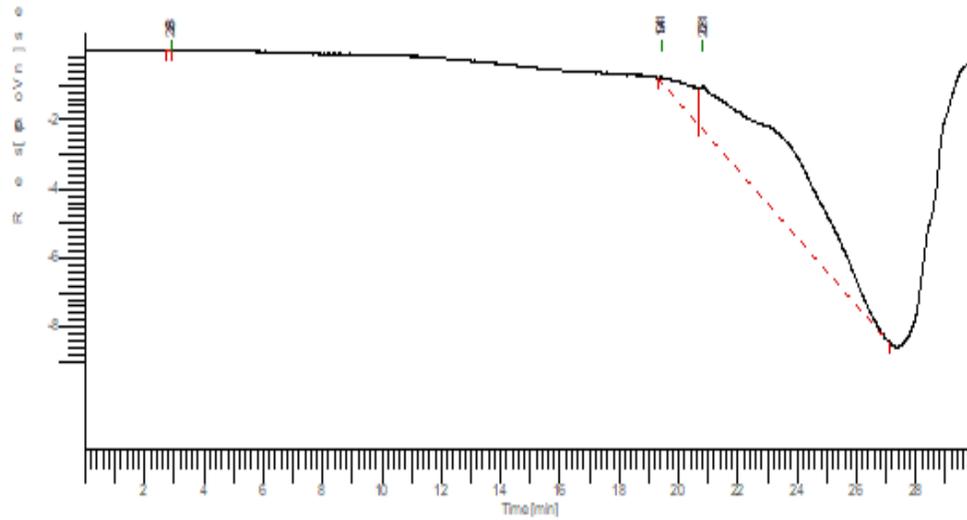
Anexo No.8
Informe de Resultados para Evaluación de Parámetros de
Desempeño de La Metodología.

El informe de resultados debe contener la información siguiente:

- Hacer referencia al protocolo utilizado
- Parámetros evaluados y criterios de aceptación
- Resultados Analíticos
- Resultados Estadísticos
- Interpretación de resultados y/o conclusiones
- Cuadro resumen de los resultados obtenidos (parámetro. criterio, resultado y conclusión)
- Declaración de Aptitud del Método
- Datos crudos de la Evaluación.

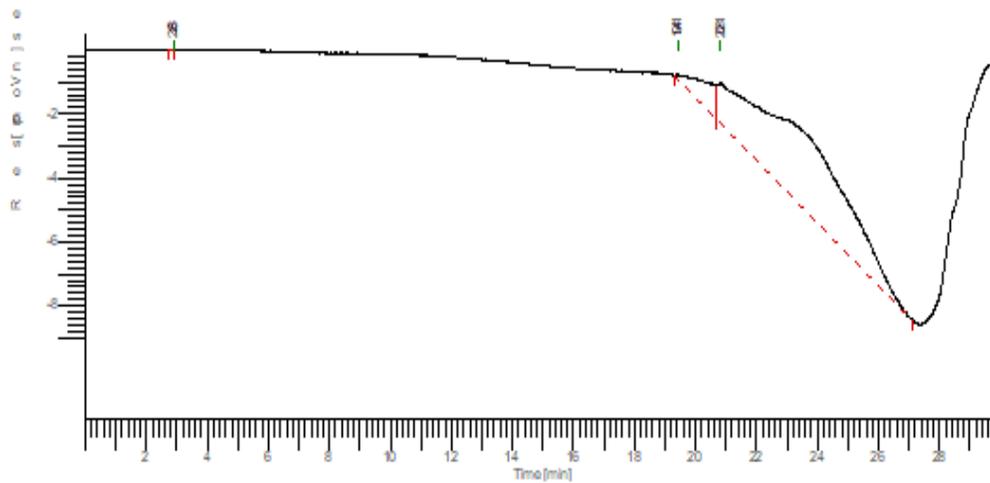
Anexo No.9
Cromatogramas Obtenidos Para La Evaluación de Parámetro de
Selectividad/Especificidad de la Metodología.

Blanco a 465 nm



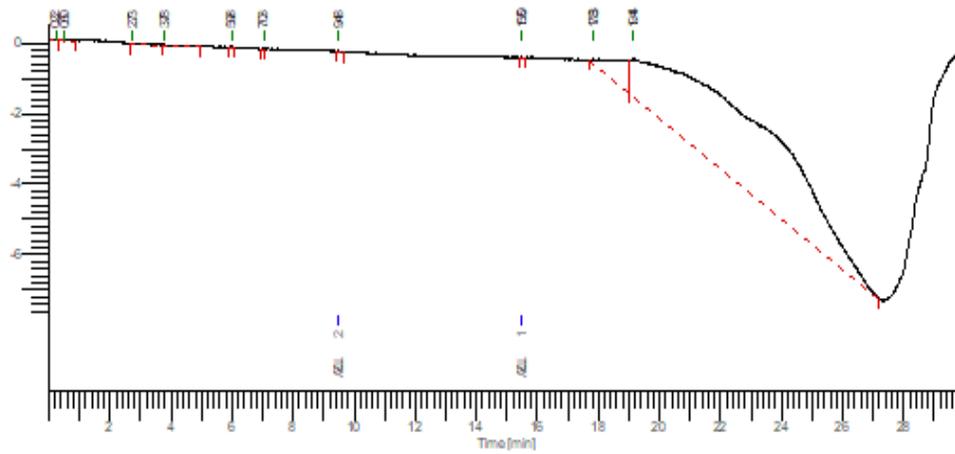
Cromatograma del blanco utilizado en el análisis por HPLC a 465 nm. Elaboración propia

Blanco a 610 nm



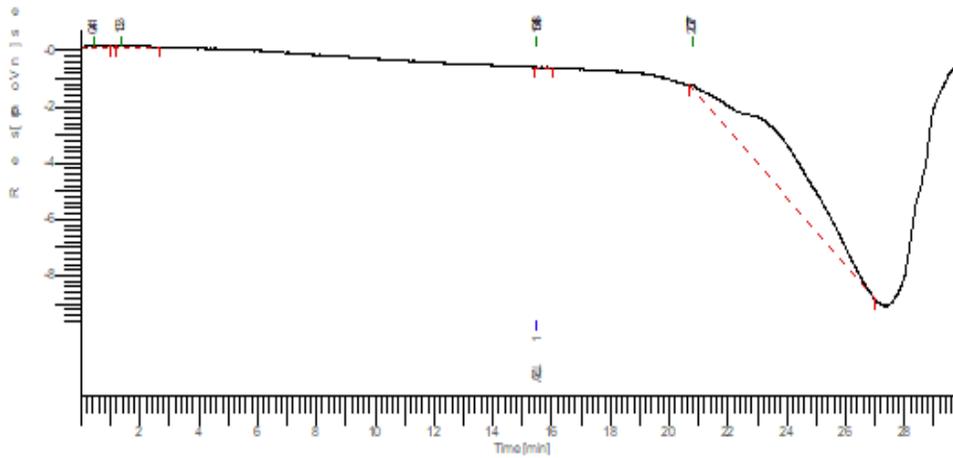
Cromatograma del blanco utilizado en el análisis por HPLC a 610 nm. Elaboración propia

Frente solvente a 465 nm



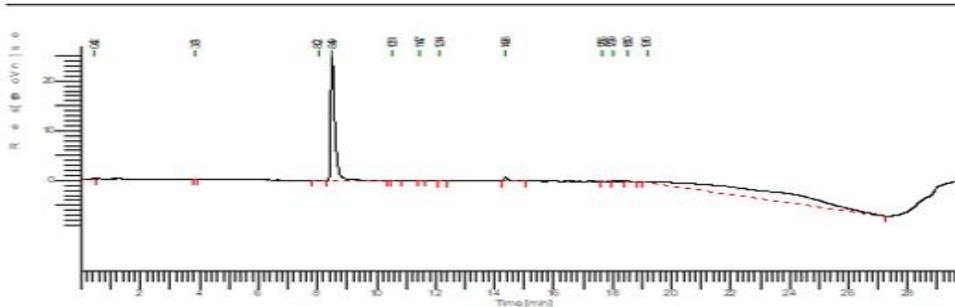
Cromatograma de la fase móvil utilizada en el análisis por HPLC a 465 nm.
Elaboración propia

Frente solvente a 610 nm



Cromatograma de la fase móvil utilizada en el análisis por HPLC a 610 nm.
Elaboración propia

Rojo N°2 a 465 nm

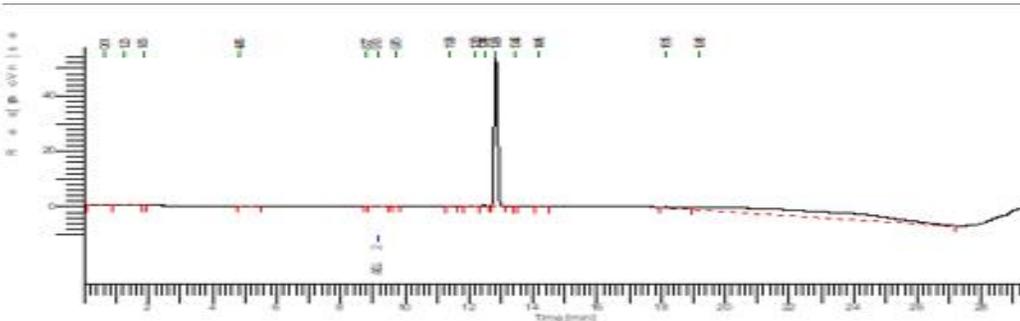


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.424	535.96	0.0005
2		3.828	135.96	0.0001
3		6.022	1013.38	0.0010
4		8.494	242506.26	0.2425
5		10.512	363.18	0.0004
6		11.474	410.43	0.0004
7		12.143	422.93	0.0004
8		14.377	6800.69	0.0068
9		17.661	315.55	0.0003

Cromatograma de estándar de colorante Rojo N°2 a 465nm. Elaboración propia

Rojo N°40 a 465 nm

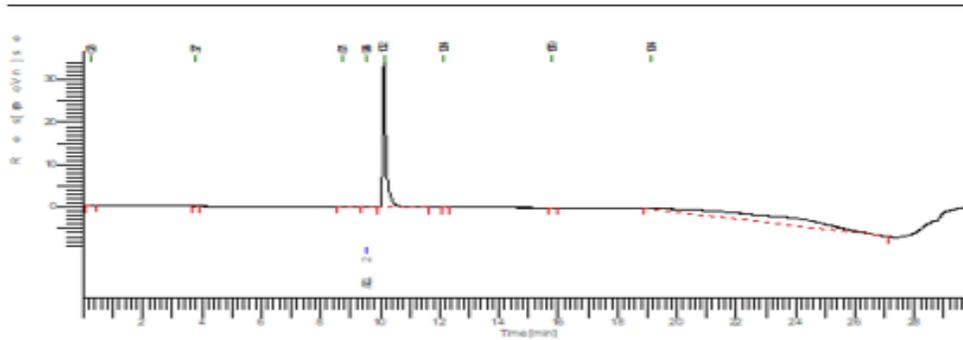


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.612	2142.29	0.0021
2		1.231	2778.32	0.0028
3		1.833	166.45	0.0002
4		4.858	868.65	0.0009
5		8.771	119.81	0.0001
6	AZUL 2	9.134	896.10	0.0009
7		9.703	254.06	0.0003
8		11.382	705.23	0.0007
9		12.201	493.98	0.0005
10		12.475	2833.26	0.0028
11		12.831	378595.44	0.3786

Cromatograma de estándar de colorante Rojo N°40 a 465nm. Elaboración propia

Rojo 4R a 465 nm

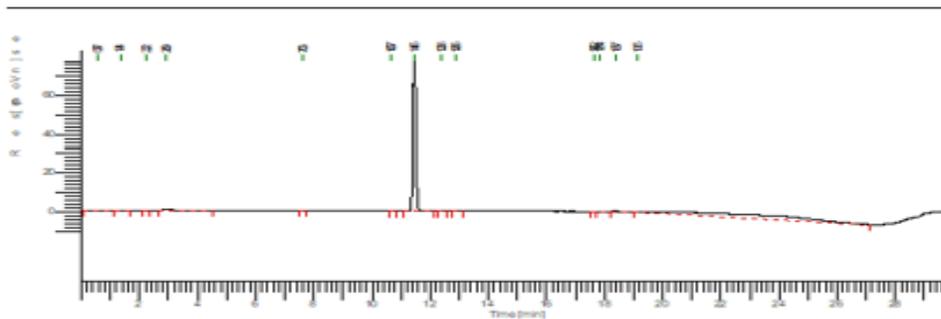


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.233	703.56	0.0007
2		3.768	185.28	0.0002
3		8.713	1406.43	0.0014
4	AZUL 2	9.537	1790.43	0.0018
5		10.124	290523.45	0.2905
6		12.143	576.75	0.0006
7		15.793	255.20	0.0003

Cromatograma de estándar de colorante Rojo 4R a 465 nm. Elaboración propia

Amarillo N°6 a 465 nm

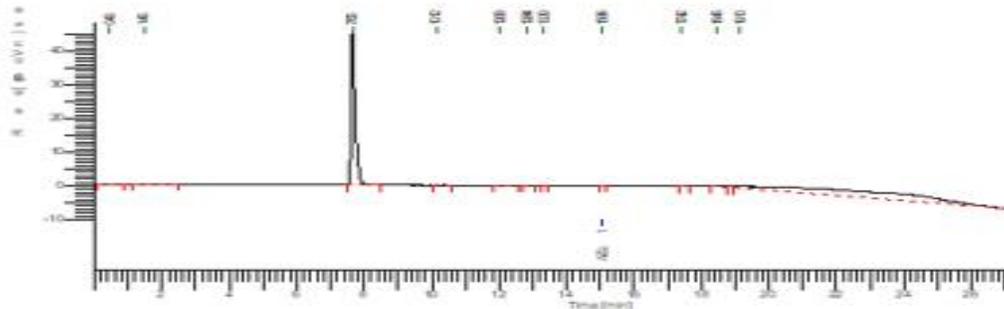


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.574	3097.72	0.0031
2		1.336	1490.83	0.0015
3		2.215	262.06	0.0003
4		2.892	15776.87	0.0158
5		7.626	171.42	0.0002
6		10.668	221.85	0.0002
7		11.445	564996.75	0.5650
8		12.382	3582.48	0.0036
9		12.863	401.50	0.0004
10		17.624	233.19	0.0002
11		17.835	1167.36	0.0012

Cromatograma de estándar de colorante Amarillo N°6 a 465 nm. Elaboración propia

Amarillo N°5 a 465 nm

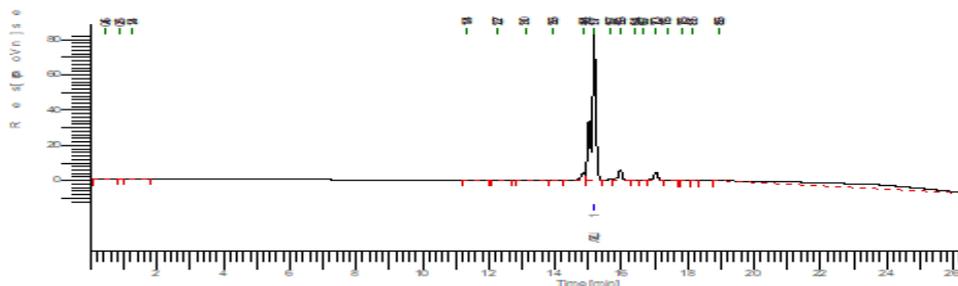


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.430	2401.99	0.0024
2		1.456	3515.69	0.0035
3		7.655	391967.53	0.3920
4		10.125	765.78	0.0008
5		12.000	1273.89	0.0013
6		12.836	506.75	0.0005
7		13.295	161.66	0.0002
8	AZUL 1	15.055	243.06	0.0000
9		17.418	341.26	0.0003

Cromatograma de estándar de colorante Amarillo N°5 a 465 nm. Elaboración propia

Azul N°1 a 610 nm

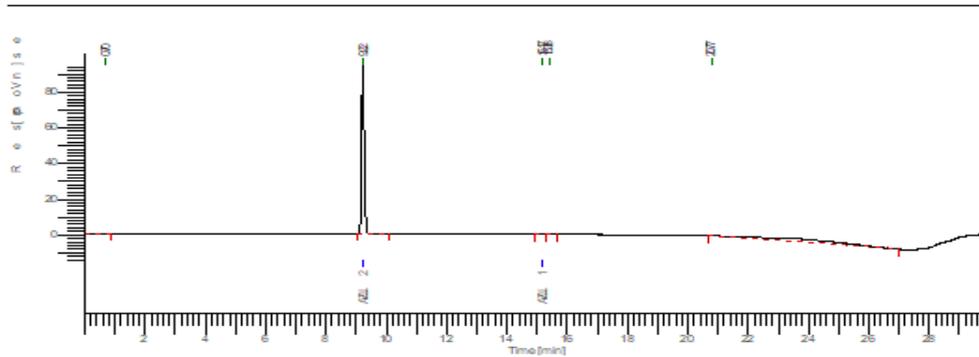


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.459	2081.25	0.0021
2		0.852	383.48	0.0004
3		1.236	1977.52	0.0020
4		11.340	1078.82	0.0011
5		12.269	724.10	0.0007
6		13.100	1692.53	0.0017
7		13.950	887.98	0.0009
8		14.840	36048.04	0.0360
9	AZUL 1	15.175	792188.12	0.0000
10		15.667	6359.63	0.0064

Cromatograma de estándar de colorante Azul N°1 a 610 nm. Elaboración propia

Azul N°2 a 610 nm

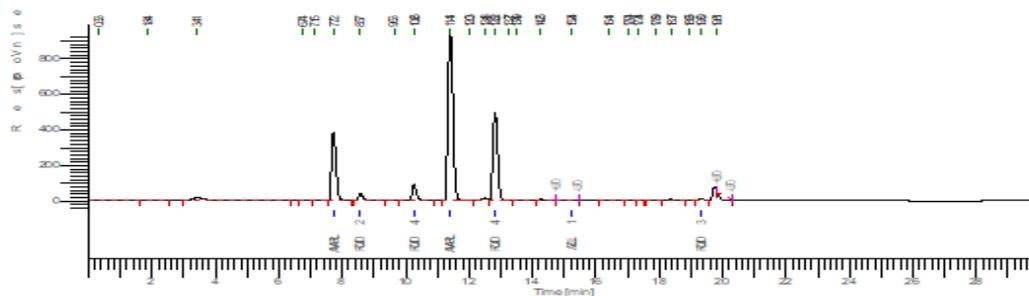


MEZCLA COLORANTES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Adjusted Amount
1		0.703	2215.58	0.0022
2	AZUL 2	9.216	62240.81	0.6224
3	AZUL 1	15.169	908.13	0.0000
4		15.382	1628.12	0.0016

Cromatograma de estándar de colorante Azul N°2 a 610 nm. Elaboración propia

Mezcla de colorantes a 465 nm

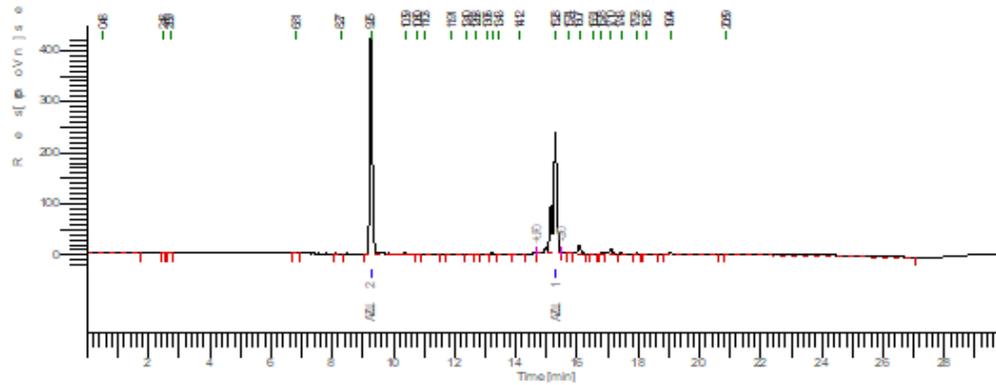


REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre del Analito	Tiempo Retencion [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
3		3.408	270475.02	0.2705
6	Amarillo 5	7.718	3551970.85	180.9184
7	Rojo 2	8.573	290706.32	24.0556
9	Rojo 4R	10.258	717367.56	49.6672
10	Amarillo 6	11.406	10118700.53	363.9317
12		12.484	109264.05	0.1093
13	Rojo 40	12.818	4991183.41	264.4022

Cromatograma de mezcla de colorantes a 465 nm. Elaboración propia

Mezcla de colorantes a 610 nm



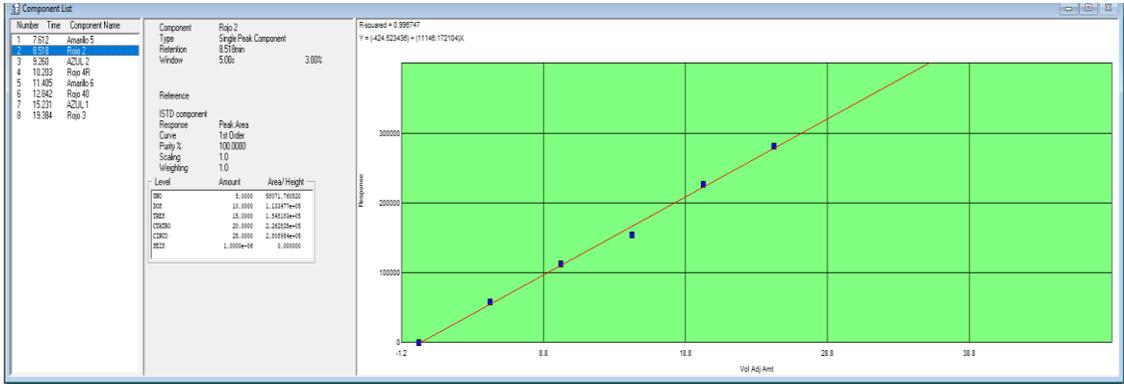
REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre del Analito	Tiempo Retencion [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
6	AZUL 2	9.260	2632102.11	175.9988
17	AZUL 1	15.283	2055942.92	56.5953
19		16.066	118183.88	0.1182
22		17.105	62652.57	0.0627

Cromatograma de mezcla de colorantes a 610 nm. Elaboración propia

Anexo No.10
Cromatogramas Obtenidos Para La Evaluación de Parámetro de
Linealidad de la Metodología.

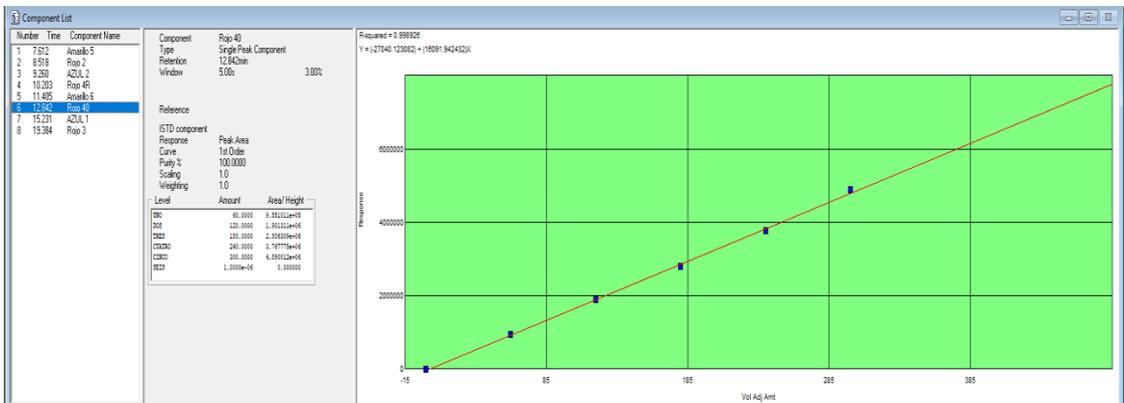
Rojo N°2



Grafica de concentración vs respuesta analítica para Rojo N°2.

$r = 0.9967$

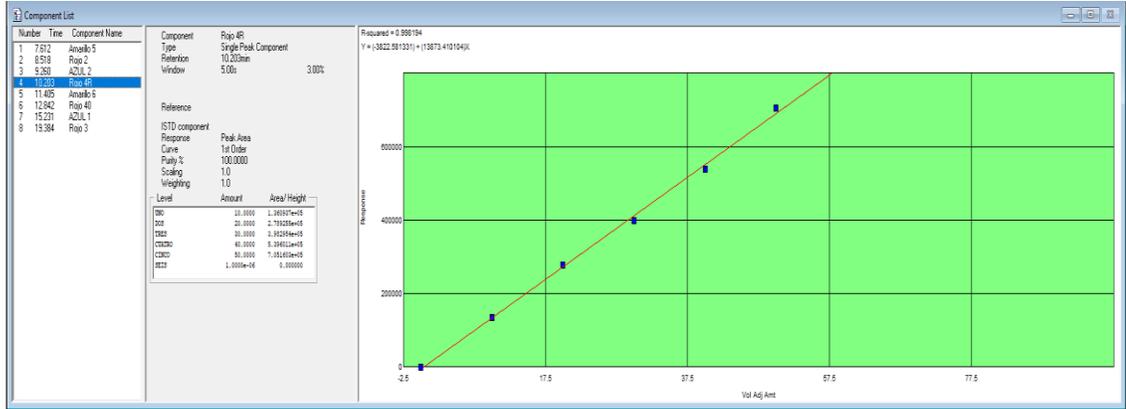
Rojo N°40



Grafica de concentración vs respuesta analítica para Rojo N°40.

$r = 0.9989$

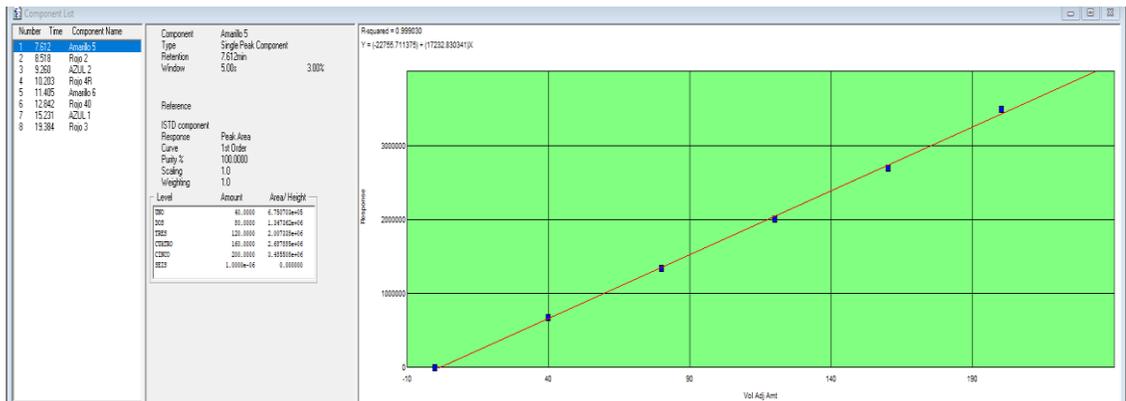
Rojo 4R



Grafica de concentración vs respuesta analítica para Rojo 4R.

$r = 0.9981$

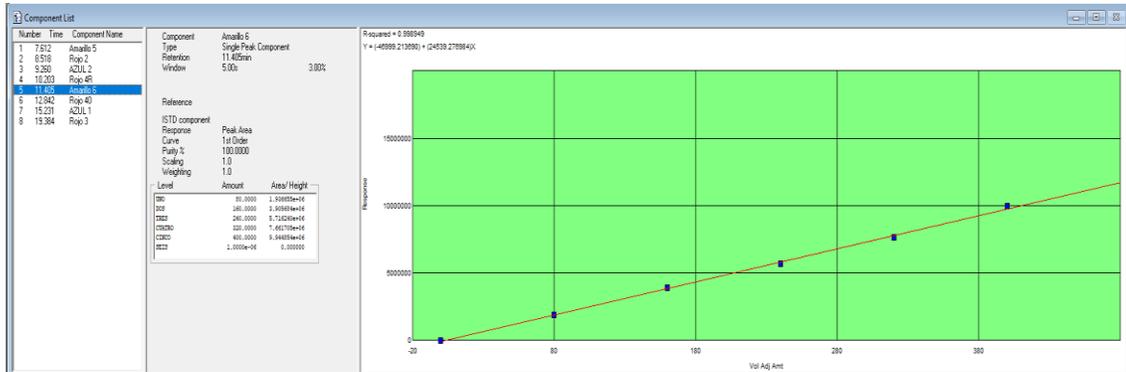
Amarillo N°5



Grafica de concentración vs respuesta analítica para Amarillo N°5.

$r = 0.9990$

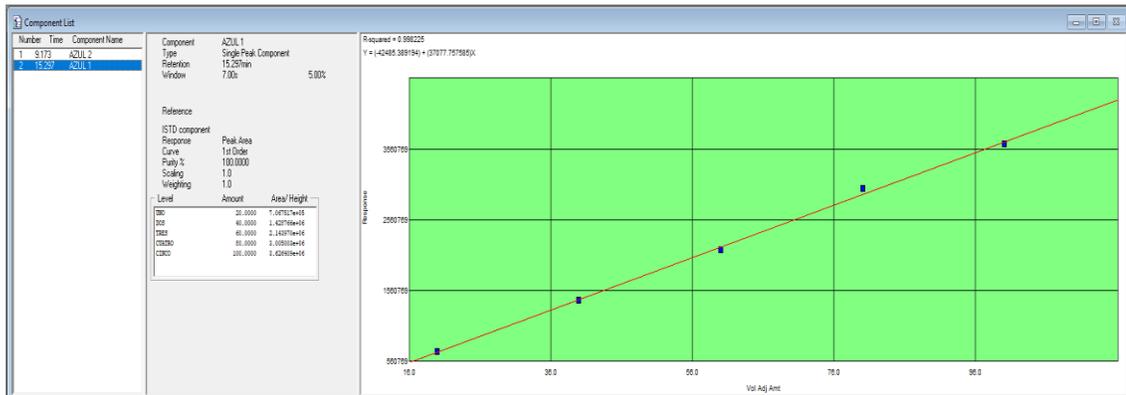
Amarillo N°6



Grafica de concentración vs respuesta analítica para Amarillo N°6.

$r = 0.9989$

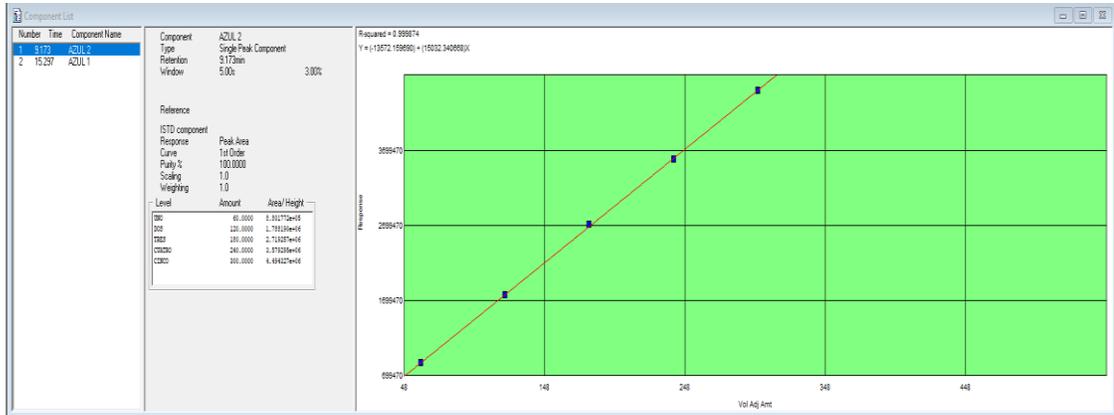
Azul N°1



Grafica de concentración vs respuesta analítica para Azul N°1.

$r = 0.9982$

Azul N°2

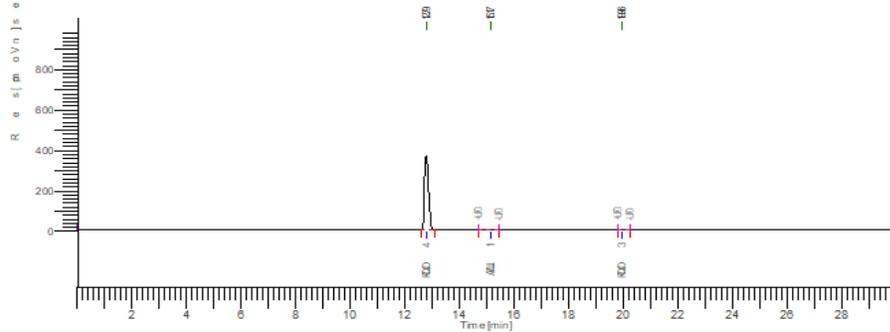


Grafica de concentración vs respuesta analítica para Azul N°2.

$r = 0.9998$

Anexo No.11
Cromatogramas Obtenidos Para Implementación del Método.

Bebida saborizada con gas 1

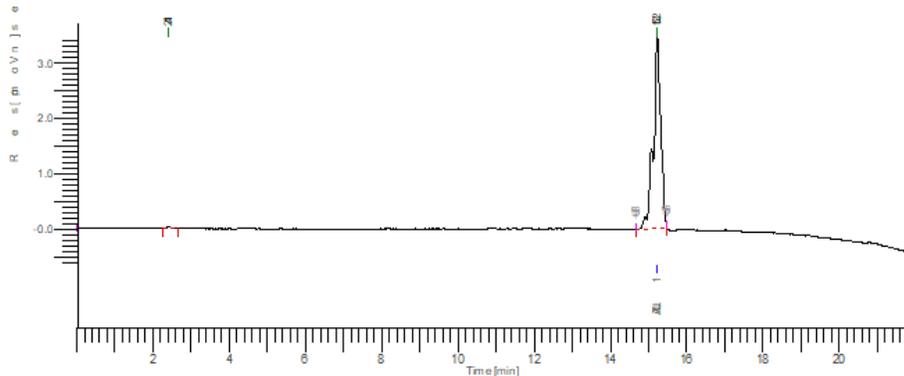


REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre Analito	Tiempo [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
1	Rojo 40	12.791	3771497.88	236.0522

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°1 a 465 nm. Elaboración propia

Bebida saborizada con gas (610 nm)

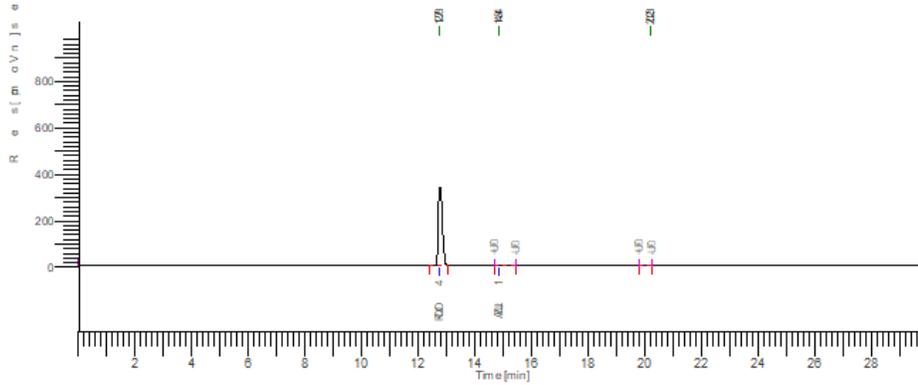


REPORTE COLORANTES PPS

No peaks available to report

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°1 a 610 nm. Elaboración propia

Bebida saborizada con gas 1 (Réplica)

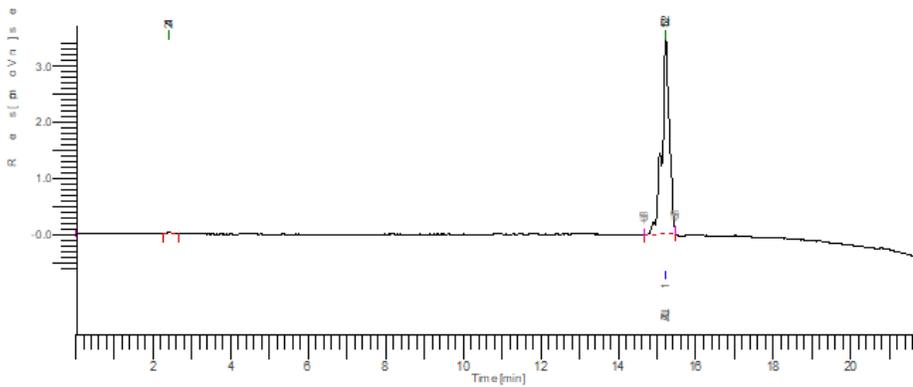


REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre Analito	Tiempo [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
1	Rojo 40	12.779	3323010.43	208.1819

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°1 a 465 nm. Réplica. Elaboración propia

Bebida saborizada con gas 1 (Réplica) 610nm

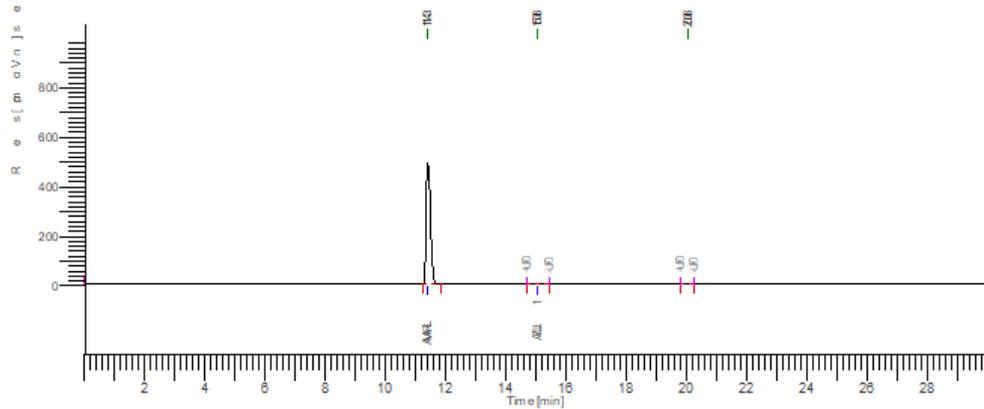


REPORTE COLORANTES PPS

No peaks available to report

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°1 a 610 nm. Réplica. Elaboración propia

Bebida saborizada con gas 2

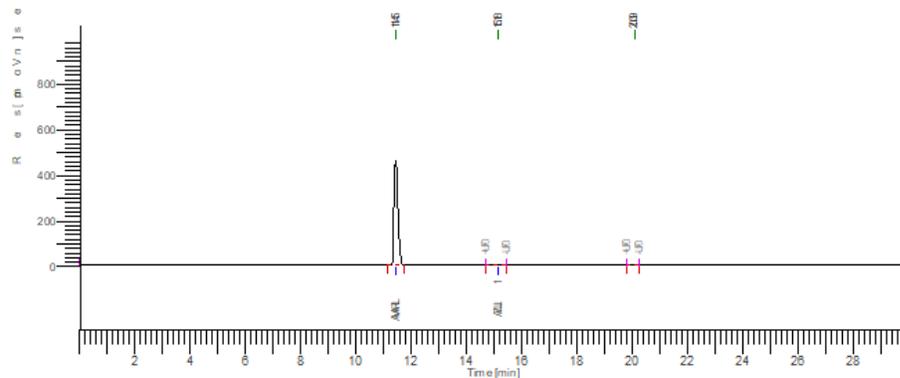


REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre Analito	Tiempo [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
1	Amarillo 6	11.425	4830264.54	198.7534

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°2 a 465 nm. Elaboración propia

Bebida saborizada con gas 2 (Réplica)

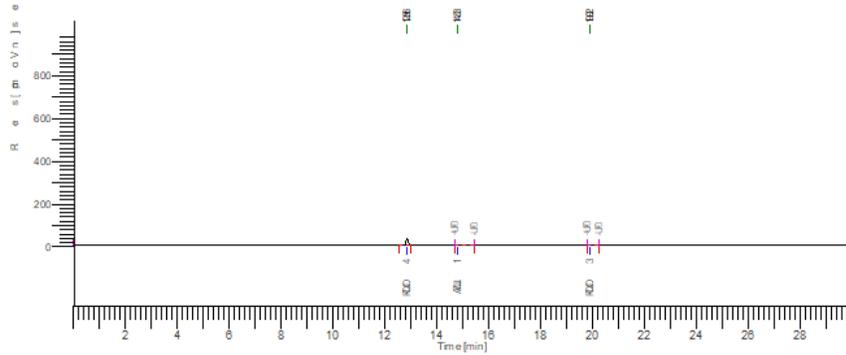


REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre Analito	Tiempo [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
1	Amarillo 6	11.451	4429703.54	182.4301

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°2 a 465 nm. Réplica. Elaboración propia

Bebida saborizada sin gas

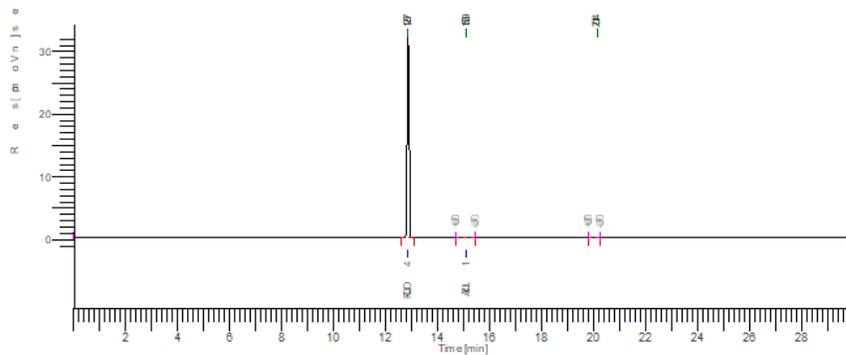


REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre Analito	Tiempo [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
1	Rojo 40	12.865	176834.60	12.6694

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°10 a 465 nm. Elaboración propia

Bebida saborizada sin gas (Réplica)



REPORTE COLORANTES

Pico #	Nombre Analito	Tiempo [min]	Area [uV*sec]	Concentracion mg/L
1	Rojo 40	12.874	189284.41	10.2831

Cromatograma para cuantificación de colorantes artificiales en bebida N°10 a 465 nm. Réplica. Elaboración propia