



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

TRABAJO FIN DE GRADO

**OPTIMIZACIÓN DE LA MEZCLA EXTRACTANTE Y DETERMINACIÓN  
MULTIVARIANTE DE ÁCIDO CARMÍNICO Y ERITROSINA EN CEREZAS DE  
CÓCTEL POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR**



**JOSÉ IGNACIO MERINO LÓPEZ**

**Tutoras:** Celia Reguera Alonso y Ana Herrero Gutiérrez

***Febrero 2018***



**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL  
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN: CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
CURSO: 2017/18**

Dña. Ana Herrero Gutiérrez y Dña. Celia Reguera Alonso informan de que el alumno D. José Ignacio Merino López, ha realizado el trabajo "Optimización de la mezcla extractante y determinación multivariante de ácido carmínico y eritrosina en cerezas de coctel por espectrofotometría de absorción molecular" bajo su tutela, y consideran que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO \*

(\*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 16 de febrero de 2018

Fdo.: Ana Herrero

Fdo.: Celia Reguera

**ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU**

D. José Ignacio Merino López y Dña. Ana Herrero Gutiérrez y Dña. Celia Reguera Alonso, autor y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto  Acceso abierto con periodo de embargo

Fdo.: José Ignacio Merino

Fdo.: Ana Herrero

Fdo.: Celia Reguera

## ÍNDICE

1. <b>Abstract/Resumen</b> .....	1
2. <b>Objetivos</b> .....	2
3. <b>Introducción</b> .....	2
4. <b>Teoría</b> .....	4
4.1. Diseño de mezclas .....	4
4.2. Función de deseabilidad .....	5
4.3. Regresión de componentes principales .....	5
5. <b>Experimental</b> .....	6
5.1. Reactivos y muestras .....	6
5.2. Procedimiento experimental .....	7
5.3. Instrumentación .....	7
6. <b>Resultados y discusión</b> .....	8
6.1. Estudios previos .....	8
6.2. Optimización de la extracción de colorantes .....	10
6.2.1. <i>Plan experimental</i> .....	10
6.2.2. <i>Obtención de las respuestas: regresión de componentes principales</i> ..	12
Análisis de componentes principales .....	13
Regresión de componentes principales .....	14
6.2.3. <i>Ajuste de los modelos en el diseño de mezclas</i> .....	15
6.2.4. <i>Análisis multirrespuesta (función de deseabilidad)</i> .....	19
6.3. Validación del procedimiento .....	21
6.3.1. <i>Exactitud: veracidad y precisión</i> .....	21
6.3.2. <i>Límite de decisión y capacidad de detección</i> .....	22
6.3.3. <i>Recuperación</i> .....	22
6.4. Determinación de colorantes en muestras problema .....	22
7. <b>Conclusiones</b> .....	23
8. <b>Bibliografía</b> .....	24

## 1. ABSTRACT/RESUMEN

The optimization of the solvent mixture to extract carminic acid (E-120) and erythrosine (E-127) in cocktail cherries was carried out in this work. The solvents studied as extractants were acetone, water and ethanol. An extreme vertices design was performed to fit the coefficients of a special cubic model which relates the concentration of each food colour with the extracting mixture components. As the molecular absorption spectra of E-120 and E-127 are overlapped, multivariate calibration models were performed to determine the extracted amount of each food colour. The desirability function was used to simultaneously approach the optimization of the extraction of both additives. The optimum conditions found for the extraction were: water 37,5%, acetone 55,2% and ethanol 7,3%. The analytical procedure used was validated. The determination of E-120 and E-127 was carried out in different commercial test samples by means of principal component regression.

En este trabajo se ha llevado a cabo la optimización de la mezcla de disolventes para extraer ácido carmínico (E-120) y eritrosina (E-127) en cerezas de cóctel. Los disolventes estudiados como extractantes fueron acetona, agua y etanol. Se realizó un diseño de vértices extremos para ajustar los coeficientes de un modelo cúbico especial que relaciona la concentración de cada colorante alimentario extraído con la composición de la mezcla de extracción. Como los espectros de absorción molecular del E-120 y el E-127 están solapados, se utilizaron modelos de calibrado multivariantes para determinar la concentración de la cantidad extraída de cada colorante alimentario. La función de deseabilidad se usó para abordar la optimización simultánea de la extracción de ambos aditivos. Las condiciones óptimas encontradas para la extracción fueron: 37,5% de agua, 55,2% de acetona y 7,3% de etanol. El procedimiento analítico utilizado se validó. Los colorantes E-120 y E-127 se determinaron en diversas muestras comerciales mediante regresión de componentes principales.

## 2. OBJECTIVES

The objectives of this work have been to:

- Optimize the proportion of water, ethanol and acetone to extract E-120 and E-127 from cocktail cherries.
- Apply the methodology of experimental mixture design and multi-response optimization through desirability functions.
- Approach the lack of selectivity of the spectral signals by means of multivariate regression methods.
- Validate the analytical procedures developed for the extraction and determination of both dyes.
- Determine the concentration of E-120 and E-127 in cocktail cherries.

## 3. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria está en continua evolución y desarrollo de productos y alimentos para la satisfacción de los consumidores, tanto en seguridad alimentaria como en las propiedades organolépticas. La primera cualidad organoléptica que percibimos al ver un alimento es el color, por lo que para potenciarlo se utilizan colorantes, que junto con los conservantes y potenciadores del sabor, entre otros, están dentro del grupo de aditivos. Son sustancias que se añaden intencionadamente para mejorar el aspecto del producto, corrigiendo la variabilidad que puede presentar la materia prima o durante el procesado, aunque nutricionalmente son prescindibles.

Los colorantes se pueden clasificar como naturales o sintéticos. Se considera colorante natural a aquel que procede de origen animal, vegetal o mineral. Estos son inestables y delicados. Mientras que los colorantes sintéticos son muy estables, brillantes, ofreciendo una mayor gama de tonalidades, y baratos. Además de que suelen ser resistentes a valores altos de pH y temperaturas altas, y solubles en agua. Por el contrario, presentan mayores riesgos de toxicidad, lo que hace que estén en continuo estudio [1]. Los colorantes naturales, en ocasiones, no logran aportar suficiente color o estabilidad durante el procesado o almacenaje, por lo que se recurre a los colorantes sintéticos.

La utilización de colorantes esta legislada por el Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios [2], el cual incluye las normas de utilización para asegurar la salud de los consumidores. Este reglamento establece listas comunitarias de los diferentes aditivos alimentarios autorizados, que figuran en los anexos I y II, las normas para su etiquetado, así como las condiciones de utilización. En el año 2011, la lista de colorantes autorizados fue modificada en el Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011 [3].

Existen una gran cantidad de colorantes sintéticos y naturales, y en este trabajo se han estudiado el ácido carmínico (E-120), la eritrosina (E-127) y el rojo allura AC (E-129). El ácido carmínico es un pigmento natural de color rojo vivo similar al carmín oscuro. Se obtiene aplastando insectos de la familia cochinilla. Su estructura química completa se muestra en la Figura 1a. En realidad, el ácido por sí solo no tiene color, obteniéndolo solo cuando se une al aluminio, calcio o amoníaco [4]. Se usa en queso curado, queso fundido o productos a base de queso, confituras, jaleas, vino aromatizado, cereales de desayuno, preparados cárnicos, pescado y derivados, y

conservas de frutos rojos como cerezas para cóctel. Tiene una dosis máxima permitida de 200 mg/kg en diversos productos [3]. Varios estudios señalan que un consumo elevado de este colorante puede provocar hiperactividad, asma, shock anafiláctico e insomnio, siendo especialmente peligroso si se mezcla con analgésicos en niños.

La eritrosina es un compuesto sintético perteneciente al grupo de los xantenos, su molécula contiene 4 átomos de yodo y es de color rojo cereza violácea. Su estructura química completa se muestra en la Figura 1b. Presenta una sensibilidad elevada a la acción de la luz, lo que supone un inconveniente tecnológico. Fue el colorante alimentario más popular en postres lácteos con aroma de fresa, aunque algunos estudios determinaron que, si se degradaba la molécula, el yodo se liberaba, provocando problemas de tiroides en el consumidor. Por lo que hoy en día solo está permitido en cerezas de cóctel. Respecto a los efectos secundarios, numerosos estudios relacionaron su consumo con la inhibición de pepsina y su comportamiento como un xenoestrógeno, y con el déficit de atención en niños (TDAH). Por todo ello, la EFSA (European Food Safety Authority) fijó su ingesta diaria admisible (IDA) en 0,1 mg/kg de masa corporal [4], estableciéndose una dosis máxima de 200 mg/kg de producto únicamente en cerezas confitadas o de cóctel [3].

El rojo allura AC es un derivado del petróleo perteneciente al grupo de colorantes azoicos, de color rojo oscuro muy soluble en agua. Su estructura química completa se muestra en la Figura 1c. Es el colorante rojo más utilizado del momento, y fue creado como sustituto del colorante amaranto (E-123) en Estados Unidos. Su uso está permitido en productos cárnicos y derivados, conservas de frutos rojos y en cerezas de cóctel. Aunque diferentes estudios hablan de que puede producir trastorno por déficit de atención e hiperactividad en niños, al ser un colorante azoico puede provocar intolerancia al ácido salicílico y dañar el ADN en dosis bajas [4], por lo que se estableció una dosis máxima de 200 mg/kg de producto [3].

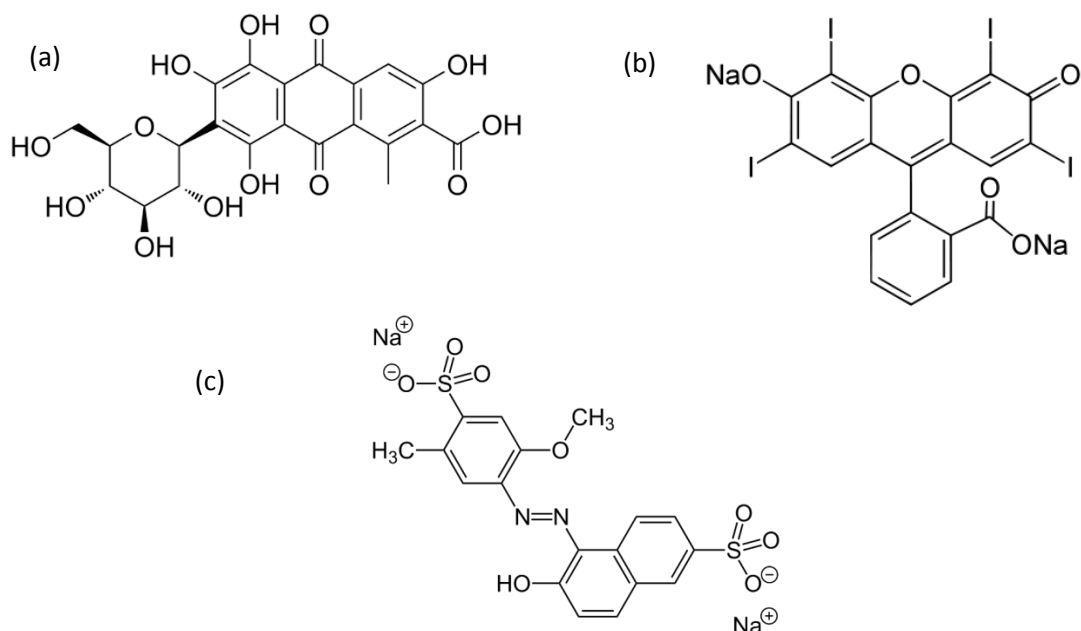


Figura 1. Estructura química del (a) ácido carmínico, (b) la eritrosina y (c) el rojo allura AC.

En la producción de cerezas de cóctel, la primera operación que se realiza es la decoloración de la fruta, y seguido, una coloración artificial. Por lo que el producto sólo

contiene los colorantes añadidos que aparecen en la etiqueta. El primer paso que se realiza es sumergir las cerezas en una disolución de SO<sub>2</sub> inmediatamente después de ser cosechadas. Este medio favorece la eliminación del pigmento natural, dejando la fruta blanquecina. El segundo paso es la coloración, la cual tiene lugar una vez desulfatadas las cerezas. Se introducen en un medio acuoso y se calienta por encima de 90°C. Una vez alcanzada esta temperatura, se añade una mezcla de colorante y sal de calcio comestible, y se mantiene durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se añade ácido cítrico y se vuelve a dejar 30 minutos. Por último, se añade hidróxido sódico gradualmente. La sal de calcio comestible fija el colorante a la cereza y evita que migre al exterior. El ácido cítrico se añade para reducir el pH a valores donde el pigmento sea insoluble, por el contrario, el hidróxido de sodio se añade para aumentar el pH a 6. Por último, se extraen las cerezas y se aclaran con agua fría. Así conseguimos unas cerezas de un atractivo color rojo uniforme [5].

Es importante determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de un colorante, ya sea natural o artificial, por lo que existe una gran cantidad de métodos de análisis, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con distintos sistemas de detección (espectrometría de masas, de UV-visible, ...), los sensores electroquímicos, la cromatografía en capa fina, la espectrofotometría o la electroforesis. Además, es importante elegir la manera óptima de extracción, que puede ser extracción líquido-líquido, sólido-líquido, filtración en membrana y ultrasonidos [6,7].

## 4. TEORÍA

### 4.1. Diseño de mezclas

En muchas áreas de desarrollo de productos o de métodos experimentales es bastante común la aplicación de experimentos que involucran mezclas. En ellos, el interés está en desarrollar formulaciones innovadoras o procedimientos experimentales mejores, con características (respuestas) óptimas capaces de satisfacer determinados requisitos. Estas características serán propiedades de la mezcla y están relacionadas con las proporciones o porcentajes de la mezcla, y no con la cantidad de mezcla.

$$\text{Respuesta medida} = f(\text{proporciones de los componentes}) \quad (1)$$

Existen unas restricciones inherentes a los diseños de mezclas para las proporciones de cada componente que se deben cumplir. Por un lado, la proporción de cada componente varía entre cero y uno, y la suma de todos los componentes de la mezcla debe sumar uno:

$$0 \leq x_i \leq 1, \quad i = 1, 2, \dots, q \quad \text{y} \quad x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (2)$$

Para desarrollar un diseño de mezclas hay que seguir una serie de pasos:

1. Definir el dominio experimental de interés.
2. Proponer un modelo empírico suponiendo que describe bien la evolución de la respuesta en estudio.
3. Plantear un diseño experimental no sólo para ajustar el modelo propuesto, sino también para verificar la adecuación del mismo.
4. Realizar el experimento de mezclas según el plan experimental.

5. Estimar los coeficientes del modelo.
6. Validar el modelo.

En los diseños de mezclas se pueden encontrar regiones experimentales distintas dependiendo de si existen restricciones o no dentro del dominio experimental. Si no hay ninguna restricción, se habla de regiones simplex (por ejemplo, el clásico diagrama ternario, para una mezcla de tres componentes); si las restricciones conducen a una región análoga a la región simplex, se habla de región simplex con restricciones. Por otro lado, están las regiones poliédricas, con una forma irregular [8].

Los modelos de superficie de respuesta o polinomiales para mezclas, desarrollados por Scheffé, se caracterizan por no tener término independiente ni términos cuadráticos o cúbicos puros. Sin embargo, resultan complejos de interpretar a partir de tres componentes, por lo que es habitual utilizar en estos casos los modelos especiales o sinérgicos de Scheffé, sólo con términos cruzados. El modelo cúbico especial, para mezclas de tres componentes, viene dado por la siguiente ecuación:

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}(X_1X_2) + b_{13}(X_1X_3) + b_{23}(X_2X_3) + b_{123}(X_1X_2X_3) \quad (3)$$

donde  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son los distintos componentes de la mezcla.

Una vez definida la región experimental y seleccionado el modelo matemático a ajustar, se debe plantear cuáles han de ser las mezclas en las que se ha de llevar a cabo la experimentación para lograr un buen ajuste con el menor esfuerzo experimental. Entre los diseños de mezclas, para las regiones poliédricas, se encuentran los diseños de vértices extremos.

## 4.2. Función de deseabilidad

Si se tienen varias respuestas que se desean optimizar, las condiciones que optimizan dichas respuestas pueden estar en conflicto y, en ese caso, es necesario recurrir a métodos de optimización multirrespuesta, como la función de deseabilidad de Derringer [9], que faciliten la optimización simultánea de todas las respuestas. Esta metodología multicriterio consiste en definir una función de deseabilidad individual,  $d_i$ , para cada respuesta. Cada una de esas funciones es una función continua y monótona que varía desde cero (respuesta no deseada) hasta 1 (respuesta óptima). La función de deseabilidad global viene dada por la media geométrica ponderada de las deseabilidades individuales.

## 4.3. Regresión de componentes principales

Cuando se dispone de señales multivariantes no específicas, no es posible abordar las medidas cuantitativas desde un punto de vista univariante. Además, en el caso de las absorbancias registradas a longitudes de onda próximas, existen altas correlaciones entre las variables, por lo que tampoco se puede utilizar la regresión lineal múltiple, ya que se tendría una gran incertidumbre en la estimación de los modelos y de las respuestas.

En estos casos, resultan de gran interés los modelos de regresión con alta capacidad predictiva, como la regresión de componentes principales [10]. Esta regresión se basa en hacer un análisis de componentes principales para extraer la información más relevante del conjunto de variables originales (denominadas variables predictoras),



para posteriormente relacionarla con la respuesta, generalmente la concentración, mediante una regresión múltiple por mínimos cuadrados.

En el análisis de componentes principales, se construyen unas nuevas variables, las componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables predictoras ( $X_1, X_2, \dots, X_p$ ), en las direcciones de máxima variabilidad de los datos. La primera componente principal se construye en la dirección de máxima varianza de las predictoras, la segunda, en la siguiente dirección de máxima variabilidad, pero que no esté correlacionada con la anterior, y así sucesivamente. De modo que las componentes explican fracciones independientes y cada vez menores de la variabilidad de las variables predictoras.

Los coeficientes de cada combinación lineal se denominan pesos, y dan idea de la participación de cada variable predictora en cada componente principal. Las coordenadas ( $CP_1, CP_2, \dots, CP_p$ ) de cada muestra en el nuevo espacio vectorial definido por las componentes principales se denominan puntuaciones.

La regresión de componentes principales consiste en establecer un modelo de regresión lineal múltiple entre una variable respuesta y las puntuaciones obtenidas mediante el análisis de componentes principales:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 CP_1 + \alpha_2 CP_2 + \dots + \alpha_q CP_q \quad (4)$$

El número de componentes principales que deben formar parte del modelo de regresión viene dado por la calidad de las predicciones de éste último. Una forma de seleccionar qué componentes aportan información útil para predecir la respuesta y deben formar parte del modelo es utilizar la regresión paso a paso hacia adelante (stepwise forward regression).

Esta técnica de selección de variables se basa en ir incorporando nuevas componentes principales al modelo, de una en una, hasta que la introducción de las restantes no produzca un aumento significativo de la suma de cuadrados debida a la regresión.

## 5. EXPERIMENTAL

### 5.1. Reactivos y muestras

Se han utilizado los colorantes ácido carmínico o E-120 (Sigma-Aldrich), eritrosina o E-127 (Merck, con una pureza mayor del 80%). Como disolventes extractantes se han utilizado acetona 99% (Cofarcas), etanol 96% (Destilerías peninsulares) y agua destilada. Para la preparación de la solución tampón se ha utilizado acetato sódico trihidrato 0,2 M y ácido acético glacial 99-100% 0,2 M, los dos reactivos de la casa comercial Prolabo.

Se han preparado disoluciones madre en agua de los colorantes E-120 y E-127 en una concentración de 100 y 50 mg/L, respectivamente. Los patrones de calibrado se obtuvieron por dilución de las anteriores en una mezcla de etanol, acetona y agua destilada, cada uno en una proporción del 33%.

Respecto a las muestras problemas, se han analizado cerezas de 4 marcas comerciales diferentes, con la siguiente composición según los fabricantes:

- Producto 1: contiene E-120 y E-127 en su lista de ingredientes.
- Producto 2: contiene E-120 y E-127 en su lista de ingredientes.
- Producto 3: contiene E-127 en su lista de ingredientes.
- Producto 4: contiene E-129 en su lista de ingredientes.

## 5.2. Procedimiento experimental

La extracción de colorantes en las muestras de cereza se llevó a cabo a partir de 3 g de cereza, triturada y homogenizada con un molino de cuchillas (Figura 2). Después se añadieron 30 mL de extractante y se mantuvo la agitación en un baño de ultrasonidos durante un tiempo determinado, después del cual se filtró la mezcla. Para obtener la medida analítica se llevaron 10 mL del filtrado obtenido y 10 mL de tampón acético-acetato (pH 5,5) a un matraz, enrasando a 25 mL con agua destilada. En el caso de los patrones de calibrado, se toma el volumen adecuado de cada disolución madre, se añaden 10 mL de tampón acético-acetato (pH 5,5) y se enrasa con agua hasta 25 mL. Posteriormente se registró el espectro de absorción molecular en el UV-Visible.



Figura 2. Molino de cuchillas para triturar las cerezas de cóctel.

## 5.3. Instrumentación

Las medidas espectrofotométricas se han realizado con un espectrofotómetro UV-visible *Cary 50 Conc de Varian*, tomando valores de absorbancia cada 10 nm entre las longitudes de onda de 380 y 650 nm. Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro *HANNA*. Por último, la extracción de las muestras se realizó a temperatura ambiente con un equipo de ultrasonidos (P-selecta) durante un tiempo determinado.

El tratamiento de datos se llevó a cabo utilizando Statgraphics, Nemrod y Detarchi. Con Statgraphics [11] se realizó la regresión de componentes principales y el diseño de mezclas. Con Nemrod [12] se estudió la función de deseabilidad. Y con Detarchi [13] se calcularon el límite de decisión y la capacidad de detección.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Estudios previos

En una primera etapa se han estudiado de forma individual los espectros de los colorantes E-127 y E-120, en distintos disolventes (agua, acetona y etanol) y mezclas de éstos. Se prepararon disoluciones de 10 mg/L de E-120 y 5 mg/L de E-127 en las mezclas que se indican en la Tabla 1. Se consideraron tanto los disolventes puros, como mezclas binarias y ternarias de los mismos.

Tabla 1. Disolventes y mezclas considerados.

<b>Mezcla</b>	<b>Agua</b>	<b>Acetona</b>	<b>Etanol</b>
<b>1</b>	100%	0%	0%
<b>2</b>	0%	100%	0%
<b>3</b>	0%	0%	100%
<b>4</b>	50%	50%	0%
<b>5</b>	50%	0%	50%
<b>6</b>	0%	50%	50%
<b>7</b>	33%	33%	33%
<b>8</b>	80%	10%	10%
<b>9</b>	15%	70%	15%
<b>10</b>	10%	80%	10%
<b>11</b>	5%	90%	5%

Se registraron los espectros de absorción de ambos colorantes en las mezclas de la Tabla 1, y se muestran en la Figura 3. Para el colorante E-127, los espectros de las mezclas que sólo contienen agua (mezcla 1) y acetona (mezcla 2) presentan bandas de absorción ligeramente desplazadas, y de menor magnitud que la correspondiente que sólo contiene etanol (mezcla 3), como se observa en la Figura 3a. Respecto al E-120, en agua y etanol presenta una banda con dos máximos, mientras que en acetona (Figura 3d) presenta una banda con un único máximo y de menor tamaño. En las mezclas binarias (Figuras 3b y 3e) y ternarias (Figuras 3c y 3f) las bandas de absorción no presentan grandes diferencias en posición y magnitud.

En general, se observa que en las mezclas tanto binarias como ternarias, las bandas de absorción no presentan desplazamientos en los máximos de pico, ni variaciones significativas en su magnitud, y además la técnica es mucho más sensible para el E-127.

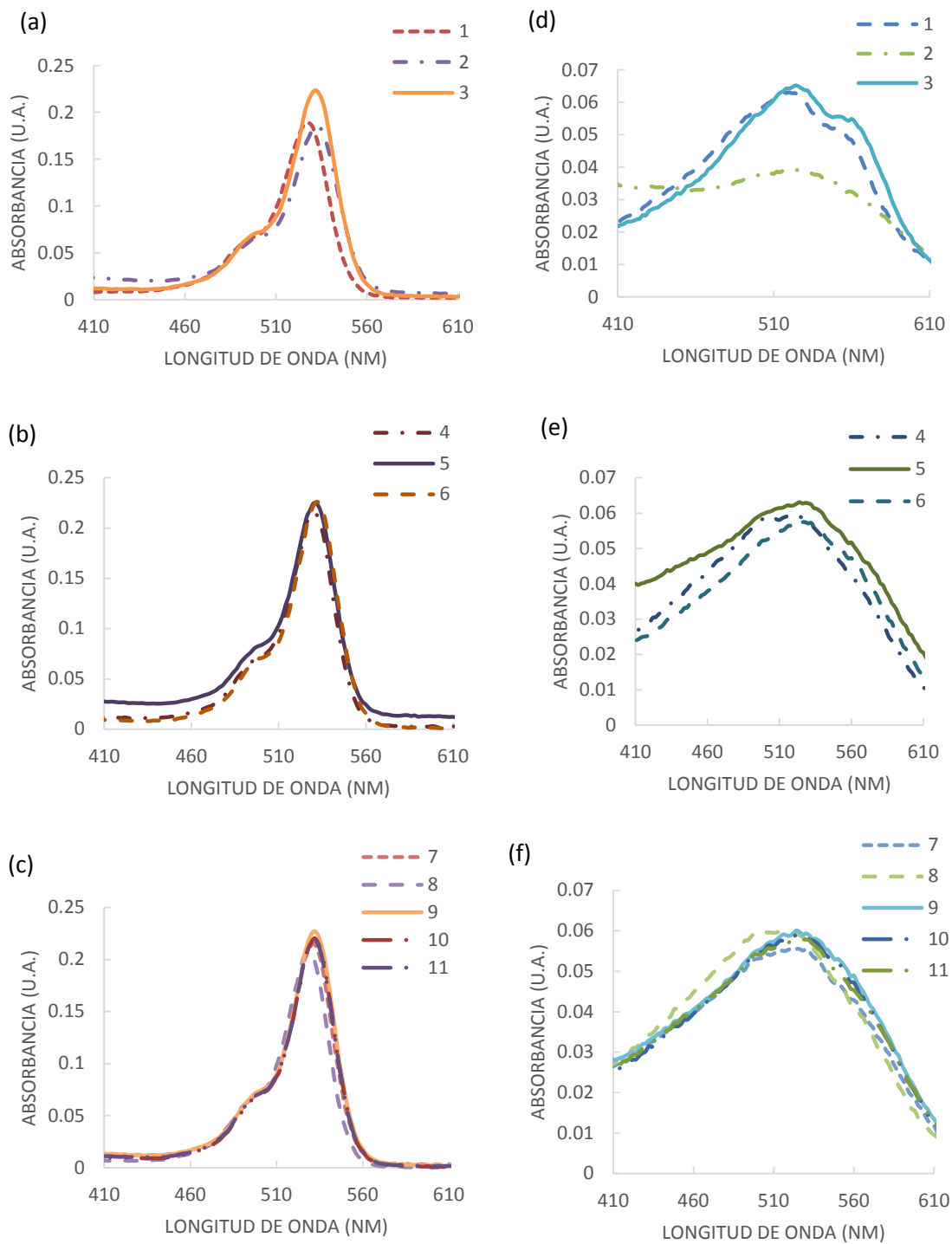


Figura 3. Espectros registrados en las distintas mezclas de disolventes de la Tabla 1. E-127: (a) disolventes puros, (b) mezclas binarias y (c) mezclas ternarias. E-120: (d) disolventes puros, (e) mezclas binarias y (f) mezclas ternarias.

## 6.2. Optimización de la extracción de colorantes

Para optimizar las condiciones de extracción de los colorantes E-120 y E-127 en las cerezas de cóctel se ha utilizado un diseño experimental de mezclas, en el cual se realizan extracciones de los colorantes con distintas mezclas de disolventes.

Los factores experimentales que se han considerado han sido etanol ( $X_1$ ), agua ( $X_2$ ) y acetona ( $X_3$ ). Sin embargo, en trabajos anteriores [14] se observó que la extracción de E-127 con proporciones elevadas de agua no era eficaz, y por tanto se ha establecido una restricción para que el agua no supere el 75% en la mezcla extractante.

Así mismo, dado que los espectros de ambos colorantes están solapados y va a ser necesario un método de calibrado multivariante, para que sea posible utilizar un mismo conjunto de calibración para distintas mezclas de disolventes, se ha establecido que la proporción de acetona no supere el 90%. Como se puede ver en las Figuras 3c y 3f, para ese porcentaje de acetona (mezcla 11) no hay diferencias con los espectros registrados con menor porcentaje de este disolvente. En el caso del etanol, no se ha considerado necesario establecer ninguna restricción.

Con estas restricciones, el dominio experimental no es una región simplex (clásico diagrama ternario de una mezcla de tres componentes), sino una región poliédrica.

Para establecer la relación entre las concentraciones de E-120 y E-127 extraídas y la composición de las mezclas de extractante, se ha seleccionado el modelo cubico sinérgico de la Ecuación (3).

### 6.2.1. Plan experimental

El diseño experimental seleccionado es un diseño de vértices extremos análogo a los diseños simplex-centroide de Scheffé, con experimentos en los vértices, los centros de las aristas, el centro de gravedad, y los puntos de control. Se han incluido réplicas en el centro de gravedad, de modo que se tienen un total de 23 experimentos. La Tabla 2 muestra el plan experimental que se ha seguido para llevar a cabo el estudio. En la Figura 4a se pueden ver los puntos experimentales y el dominio experimental.

En la Figura 4a se muestra la variación de la función de la varianza en la región experimental. Es interesante observar que la varianza es siempre  $<1$  en todos los puntos del dominio experimental, lo que garantiza predecir el valor de cada respuesta, en cualquier punto del dominio, con una calidad aceptable.

En cada experiencia del plan experimental se lleva a cabo la extracción, con la mezcla extractante correspondiente, de los colorantes de unas cerezas de cóctel que contienen E-120 y E-127. Las cerezas se someten a ultrasonidos durante 5 minutos y, a continuación, los extractos se filtran y se registra el espectro, como se indica en el procedimiento experimental.

Tabla 2. Plan experimental del diseño de mezclas y respuestas obtenidas.

Plan experimental				Respuestas	
Exp.	Etanol	Agua	Acetona	E-120 (mg/L)	E-127 (mg/L)
1	1.000	0	0	0.18	0.44
2	0.250	0.750	0	0.19	0.09
3	0.100	0	0.900	0.12	0.21
4	0	0.100	0.900	0.14	0.15
5	0	0.750	0.250	0.33	0.15
6	0.625	0.375	0	0.30	0.82
7	0.550	0	0.450	0.17	0.81
8	0.125	0.750	0.125	0.37	0.16
9	0.050	0.050	0.900	0.57	0.65
10	0	0.425	0.575	0.48	1.47
11	0.270	0.320	0.410	0.30	1.12
12	0.270	0.320	0.410	0.27	1.43
13	0.270	0.320	0.410	0.27	1.45
14	0.270	0.320	0.410	0.18	1.10
15	0.270	0.320	0.410	0.25	1.32
16	0.270	0.320	0.410	0.24	0.88
17	0.270	0.320	0.410	0.27	1.38
18	0.270	0.320	0.410	0.25	1.67
19	0.635	0.160	0.205	0.32	1.80
20	0.260	0.535	0.205	0.31	0.79
21	0.185	0.160	0.655	0.28	1.45
22	0.135	0.210	0.655	0.34	1.32
23	0.135	0.535	0.330	0.39	1.02

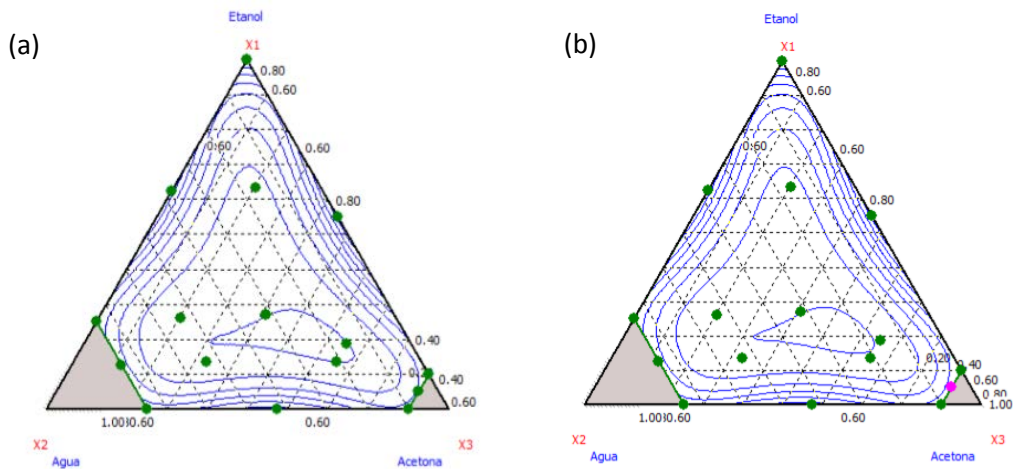


Figura 4. Puntos experimentales y curvas de isovarianza del diseño experimental (a) con todos los experimentos de la Tabla 2, y (b) sin la experiencia 9 (marcada en rosa).

### 6.2.2. Obtención de las respuestas: regresión de componentes principales

A partir de los espectros obtenidos en el apartado anterior, se calculan las concentraciones de los dos colorantes extraídos, éstas serán las respuestas en el diseño de mezclas. Para ello, dado que los espectros de los dos colorantes se encuentran solapados, ha sido necesario utilizar un método de calibrado multivariante, en este caso, la regresión de componentes principales.

El conjunto de calibrado, formado por mezclas de ambos colorantes, se muestra en la Tabla 3. Las muestras están codificadas con una C, de calibrado, seguida de dos dígitos, el primero de ellos indica la concentración de E-127 y el segundo la de E-120. Estos patrones de calibrado se han preparado según se indica en el apartado 5.1 y se ha registrado el espectro correspondiente.

Tabla 3. Codificación y concentración de los dos colorantes en las muestras del conjunto de calibrado.

Muestra	E-127 (mg/L)	E-120 (mg/L)	Muestra	E-127 (mg/L)	E-120 (mg/L)
C00	0	0	C23	2	3
C01	0	1	C24	2	4
C02	0	2	C30	3	0
C03	0	3	C31	3	1
C04	0	4	C32	3	2
C10	1	0	C33	3	3
C11	1	1	C34	3	4
C12	1	2	C40	4	0
C13	1	3	C41	4	1
C14	1	4	C42	4	2
C20	2	0	C43	4	3
C21	2	1	C44	4	4
C22	2	2			

En la Figura 5 se encuentran los espectros de las muestras del conjunto de calibrado, diferenciándose los distintitos niveles de concentración de ambos colorantes. La banda cuyo máximo se encuentra en torno a 530 nm se corresponde con el E-127, mientras que el máximo del E-120 está alrededor de 510 nm. Los 5 niveles que se aprecian más claramente hacen referencia a la concentración de E-127, mientras que los 5 espectros que se observan en cada nivel hacen referencia a la concentración del colorante E-120.

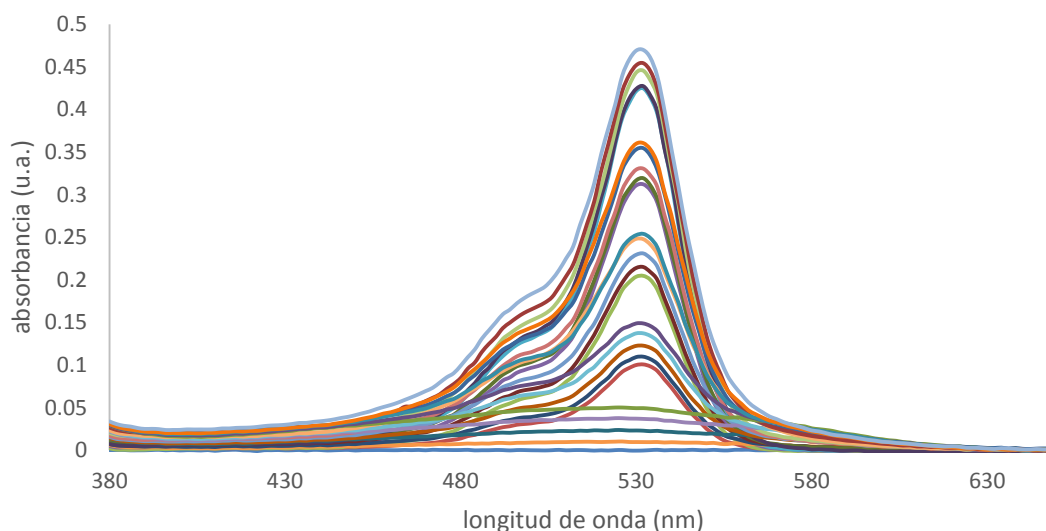


Figura 5. Espectros de las muestras de calibrado de la Tabla 3.

### **Análisis de componentes principales**

Se realizó el análisis de componentes principales con las absorbancias originales, sin ningún tipo de pretratamiento. El conjunto de aprendizaje constaba de 25 muestras, cada una de ellas con 28 variables predictoras. Con las 6 primeras componentes principales se explica prácticamente el 100% de la variabilidad de los datos, como se observa en la Tabla 4. La varianza explicada con las dos primeras componentes es del 99,9%; como puede verse en la Figura 6, las puntuaciones en el plano formado por estas dos componentes reproducen la distribución de concentraciones de las muestras de calibrado. La primera componente principal está fundamentalmente relacionada con el colorante E-120 ya que en ese eje se tienen puntuaciones mayores a medida que se incrementa la concentración del mismo (segundo dígito de la codificación), mientras que la segunda componente principal está más relacionada con la concentración del E-127 (primer dígito de la codificación). Sin embargo, sí que se puede observar que el rombo que forman las muestras se encuentra ligeramente girado.

Tabla 4. Resultados del análisis de componentes principales

<b>Componente principal</b>	<b>Autovalores</b>	<b>Varianza explicada (%)</b>	<b>Varianza acumulada (%)</b>
<b>1</b>	0,0558	97,233	97,233
<b>2</b>	0,0015	2,667	99,900
<b>3</b>	0,0000	0,079	99,979
<b>4</b>	0,0000	0,009	99,989
<b>5</b>	0,0000	0,004	99,993
<b>6</b>	0,0000	0,003	99,996



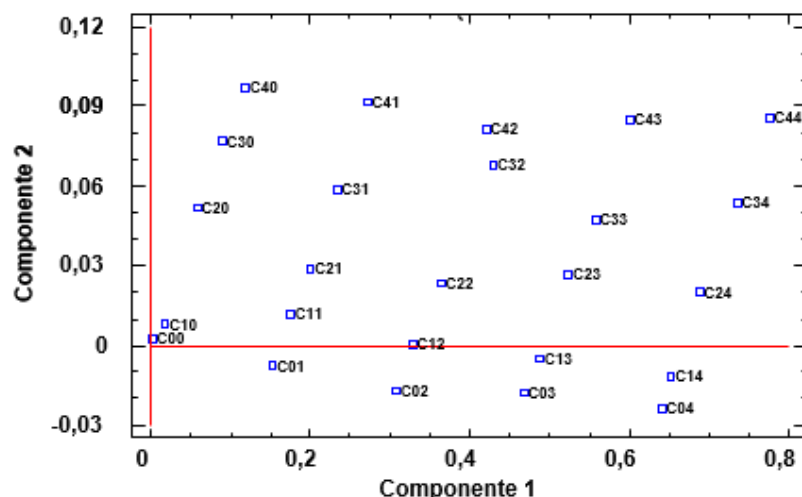


Figura 6. Puntuaciones de las dos primeras componentes principales.

### **Regresión de componentes principales**

Con las puntuaciones calculadas en el análisis de componentes principales se ajusta un modelo de regresión lineal múltiple para cada colorante. Como a priori no se sabe qué componentes principales van a resultar útiles para explicar la concentración de cada colorante, se utiliza la regresión paso a paso hacia adelante. En las Tablas 5 y 6 se muestran los coeficientes estimados en cada modelo, todos ellos significativos con un nivel de confianza del 95%, ya que el p-valor  $< 0,05$ . En el caso del colorante E-120 (Tabla 5), con 5 componentes principales se explica el 99,56% de la variabilidad de la respuesta; mientras que para el E-127 (Tabla 6) son necesarias 6 componentes principales, y se alcanza a explicar el 99,99% de la varianza. Con estos modelos de regresión se calculan las concentraciones de cada colorante en los extractos obtenidos en el diseño de mezclas; éstas se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 5. Coeficientes del modelo de regresión múltiple para el E-120.

<b>E-120</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>P-Valor</b>
<b>Constante</b>	2	0,0339	0,0000
<b>PC 1</b>	0,306	0,0082	0,0000
<b>PC 2</b>	-0,1668	0,0121	0,0000
<b>PC 3</b>	-0,2932	0,0281	0,0000
<b>PC 5</b>	-0,3262	0,0923	0,0022
<b>PC 6</b>	0,5209	0,1291	0,0007

Tabla 6. Coeficientes del modelo de regresión múltiple para el E-127.

<b>E-127</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>P-Valor</b>
<b>Constante</b>	2	0,0117	0,0000
<b>PC 1</b>	0,1369	0,0028	0,0000
<b>PC 2</b>	0,4423	0,0041	0,0000
<b>PC 3</b>	0,2712	0,0097	0,0000
<b>PC 4</b>	-0,3401	0,0272	0,0000
<b>PC 5</b>	0,2727	0,0318	0,0000
<b>PC 6</b>	-0,1335	0,0444	0,0077

### 6.2.3. Ajuste de los modelos en el diseño de mezclas.

Con las respuestas de la Tabla 2 se ajusta el modelo de superficie de respuesta de la Ecuación 3 para cada uno de los colorantes. Los coeficientes estimados para el E-127 se muestran en la Tabla 7; este modelo explica el 78% de la varianza de la respuesta. Como se puede observar en el ANOVA de la Tabla 8, se tiene que la regresión es significativa, con un nivel de confianza del 95%, debido a que la significación es menor del 5% ( $H_0$ : el modelo no es significativo). Y no presenta fallo de ajuste a ese nivel de confianza ya que la significación es mayor de 5% ( $H_0$ : no hay fallo de ajuste).

Tabla 7. Coeficientes del modelo de superficie de respuesta ajustado para el E-127.

<b>Nombre</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Signif. %</b>
<b>b<sub>1</sub></b>	0,491	0,281	10,0
<b>b<sub>2</sub></b>	-1.703	0,493	0,327 **
<b>b<sub>3</sub></b>	-0,092	0,25	71,8
<b>b<sub>12</sub></b>	5,734	2	0,674 **
<b>b<sub>1-3</sub></b>	3,498	1	2,98 *
<b>b<sub>2-3</sub></b>	8,375	2	0,0324 ***
<b>b<sub>1-2-3</sub></b>	-5,058	8	51,3

Tabla 8. Análisis de la varianza del modelo ajustado para el E-127.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de los cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Razón</b>	<b>Signif %</b>
<b>Regresión</b>	50.219	6	0.8370	100.023	0.0115 ***
<b>Residuos</b>	13.389	16	0.0837		
<b>Fallo de ajuste</b>	0.912	9	0.1013	16.608	25.8
<b>Error</b>	0.427	7	0.0610		
<b>Total</b>	63.607	22			

En cuanto al estudio de posibles datos anómalos, no se observan datos con residuos estudentizados anormalmente grandes (Figura 7a); además, en la Figura 7b se observa que los residuos siguen una distribución normal.

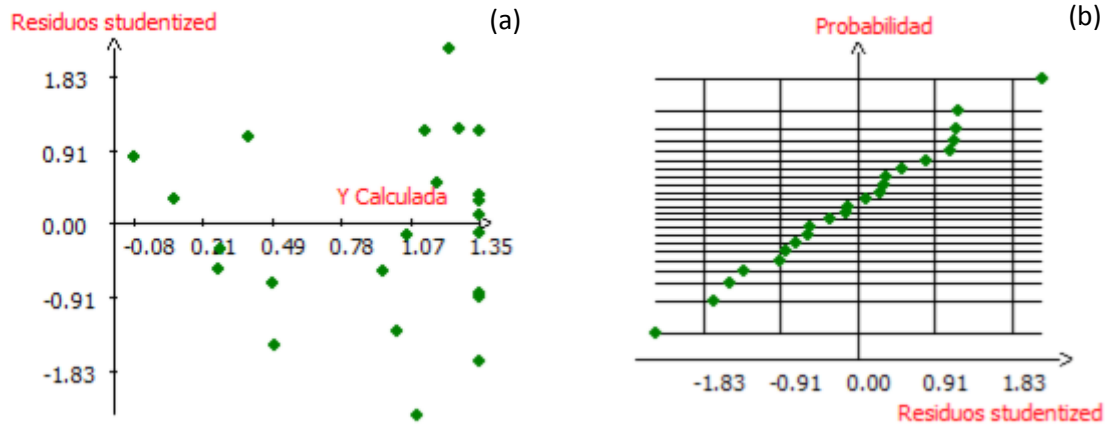


Figura 7. (a) Residuos estudentizados y (b) grafico de normalidad para el E-127.

Una vez validado el modelo, se estudia la superficie de respuesta ajustada (Figura 8). Se puede ver que ésta tiene un máximo en torno al centro de gravedad de la región experimental; se extrae más E-127 con la mezcla ternaria formada por 32% de etanol, 30% de agua y 38% de acetona.

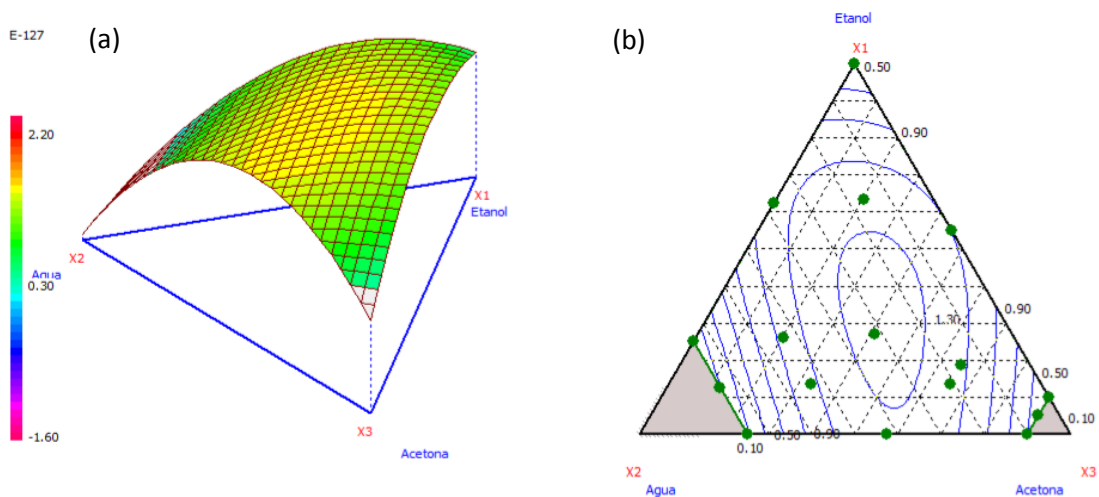


Figura 8. (a) Superficie de respuesta y (b) curvas de nivel del modelo para el E-127.

Por otro lado, el modelo para el E-120 con todos los datos, aunque era significativo, presentaba fallo de ajuste a un nivel de significación del 5% (significación = 0,07%). Al analizar los residuos estudentizados de este modelo (Figura 9a y 9b), se observa la presencia de un dato anómalo (en rojo en la figura), el punto 9 de la tabla 2. De hecho,

al revisar la experimentación realizada se observó, como se puede ver en la Figura 10, que esa muestra presentaba ciertas anomalías. Por lo que se decidió eliminar este dato y ajustar un nuevo modelo con los datos restantes.

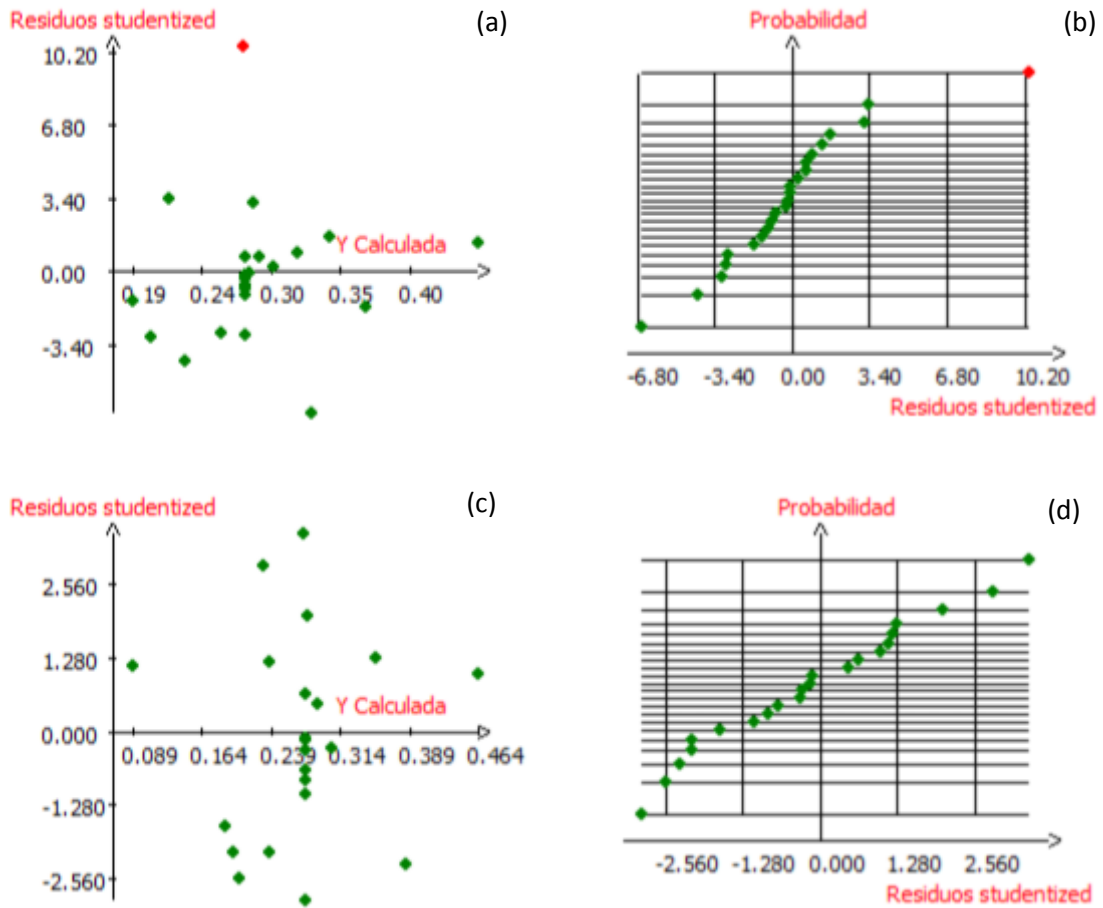


Figura 9. Análisis de residuos de los modelos ajustados para el E-120 (a y b) con todos los datos y (c y d) sin el dato anómalo.



Figura 10. Muestras correspondientes a las experiencias 9, 10 y 14 del plan experimental.

La función de varianza, estimada sin ese dato, (Figura 4b) se sigue manteniendo por debajo de 1 en todo el dominio experimental. Los coeficientes del nuevo modelo, que explica el 70% de la varianza de la respuesta, se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Coeficientes del modelo de superficie de respuesta ajustado para el E-120.

Nombre	Coeficiente	Desviación típica	Signif. %
<b>b<sub>1</sub></b>	0.190	0.033	0.0741 ***
<b>b<sub>2</sub></b>	0.091	0.059	16.7
<b>b<sub>3</sub></b>	0.046	0.035	22.9
<b>b<sub>12</sub></b>	0.652	0.220	2.10 *
<b>b1-3</b>	0.315	0.180	12.3
<b>b2-3</b>	1.630	0.226	0.0176 ***
<b>b1-2-3</b>	-3.625	0.904	0.514 **

Se realiza el análisis de la varianza del modelo ajustado, Tabla 10, que muestra que la regresión es significativa, con un nivel de confianza del 95%, debido a que su significación es menor del 5%. El modelo no presenta fallo de ajuste al 97% de confianza ya que la significación es mayor del 3%. No se observan residuos anormalmente grandes (Figura 9c), y éstos siguen una distribución normal (Figura 9d).

Tabla 10. Análisis de la varianza del modelo ajustado de E-120.

Fuente de variación	Suma de los cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón	Signif %
<b>Regresión</b>	0.1120	6	0.0187	15.7730	< 0.01 ***
<b>Residuos</b>	0.0485	15	0.0032		
<b>Fallo de ajuste</b>	0.0402	8	0.0050	4.2489	3.61 *
<b>Error</b>	0.0083	7	0.0012		
<b>Total</b>	0.1605	21			

La superficie de respuesta del modelo ajustado, Figura 11, muestra un máximo para la extracción de E-120 en una zona de mezclas binarias, concretamente para la mezcla agua-acetona al 50%.

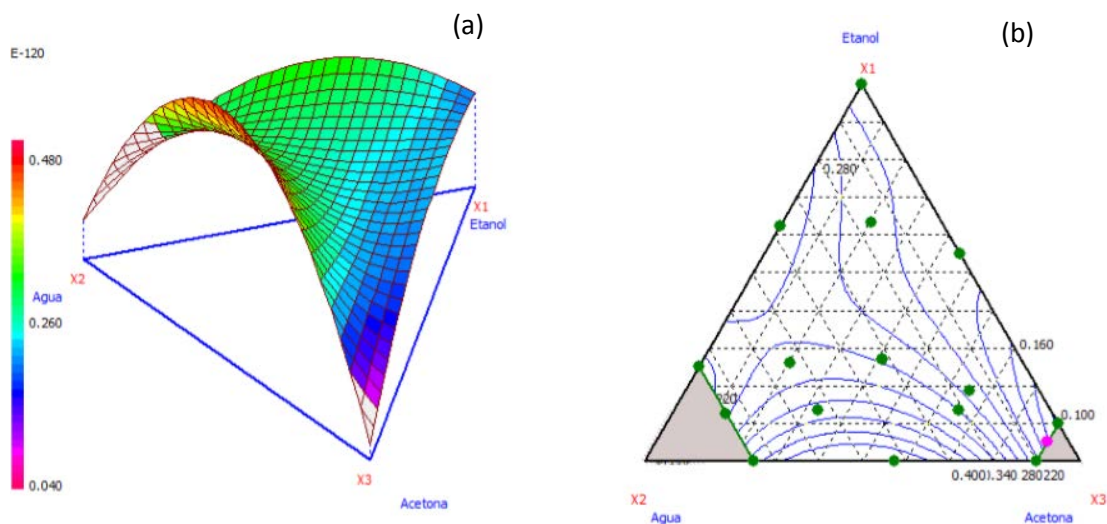


Figura 11. (a) Superficie de respuesta y (b) curvas de nivel del modelo para el E-120.

Como en análisis posteriores va a ser necesario estimar los modelos con los mismos experimentos para ambos colorantes, se eliminó el dato anómalo encontrado para el E-120 en el modelo ajustado para el E-127. Se comprobó que el nuevo modelo ajustado para este colorante mantenía la validez del modelo inicial. Así mismo, no había diferencias en los valores de los coeficientes estimados. Por lo que se puede concluir que la eliminación de este punto no afecta al modelo.

#### 6.2.4. Análisis multirrespuesta (función de deseabilidad)

Las condiciones que permiten la máxima extracción de cada uno de los colorantes difieren notablemente, como se ha visto en el apartado anterior. En el caso del E-127 es necesaria una mezcla ternaria con una participación importante de los tres disolventes, mientras que en el caso del E-120 se requiere una muestra binaria de agua-acetona al 50%. Puesto que ambos colorantes se pueden encontrar conjuntamente en las cerezas de cóctel, se hace necesario encontrar una mezcla extractante común que permita extraer la mayor cantidad de ellos y llevar a cabo un análisis simultáneo. Para ello, se utiliza la función de deseabilidad como método de optimización multirrespuesta.

Se definen las funciones de deseabilidad individuales ( $d_i$ ) para cada uno de los colorantes, que tendrán el mismo peso en la función de deseabilidad global. En el caso del E-120 (Figura 12a), mezclas extractantes que permitan tener valores de concentración por debajo de 0,29 mg/L, que supone el 60% de la máxima concentración extraída en el plan experimental, no se consideran aceptables. Mientras que valores por encima de 0,39 mg/L, que equivale al 80% de la máxima concentración extraída, se consideran óptimos, deseabilidad del 100%. Para el E-127 (Figura 12b), y siguiendo los mismos criterios para definir los valores mínimo y diana, se consideran respuestas óptimas aquellas concentraciones por encima de 1,40 mg/L, mientras que no son aceptables mezclas de extracción que lleven concentraciones extraídas menores de 1,00 mg/L.

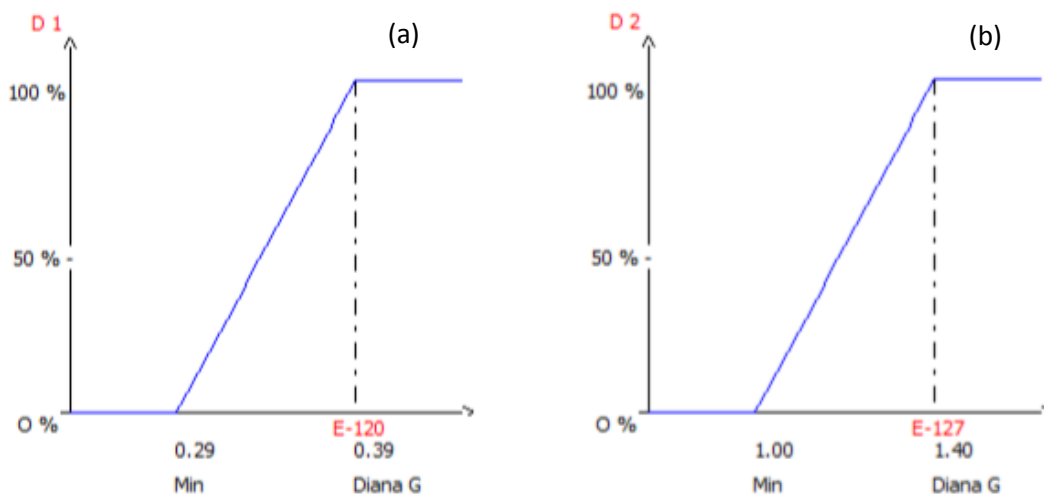


Figura 12. Funciones de deseabilidad individuales para (a) E-120 y (b) E-127.

Se alcanza un máximo para la deseabilidad global (Tabla 11) que define unas condiciones óptimas en cuanto a la mezcla extractante, que ha de estar formada por el 37,5% de agua, 55,2% de acetona y 7,3% de etanol. En este óptimo, la deseabilidad individual para el de E-127 es menor que la de E-120, 75% y 100% respectivamente. Debido a la forma de las superficies de respuesta ajustadas, la optimización, mediante la función de deseabilidad, ha priorizado que la deseabilidad alcanzada fuera mayor en el E-120 al observarse que la cantidad extraída de este colorante es menor que la de E-127 (Tabla 2).

La mezcla extractante considerada óptima para ambos colorantes conjuntamente será la empleada en la extracción de los mismos en las muestras problema.

Tabla 11. Deseabilidad individual e global, y concentración teórica en los extractos.

Colorante	Concentración (mg/L)	$d_i$ %	Peso
E-120	0.39	100.00	1
E-127	1.30	75.33	1
<b>Deseabilidad global</b>		<b>86.79</b>	

### 6.3. Validación del procedimiento

La validación del procedimiento de determinación de los colorantes E-120 y E-127 se llevó a cabo mediante la estimación de las siguientes figuras de mérito: exactitud (veracidad y precisión), recuperación, límite de decisión y capacidad de detección.

#### 6.3.1. Exactitud: veracidad y precisión

La exactitud es “el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado”, la cual se evalúa a través de la veracidad, que se define como “el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado” y la precisión, que se define como “el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas” [15].

Mediante la recta de exactitud (Tabla 12), en la que se representa la concentración predicha frente a la concentración real de los patrones de calibrado, se evalúa la exactitud en sus dos vertientes, veracidad y precisión. Si el método es veraz, la recta debe presentar una pendiente igual a 1 y una ordenada en el origen igual a 0; esto se verifica mediante los tests de hipótesis oportunos. Las hipótesis nulas en cada uno de estos test son  $H_0$ : la pendiente es igual a 1, y  $H_0$ : la ordenada en el origen es 0, respectivamente.

La precisión se puede estimar a través de la desviación típica residual ( $s_{yx}$ ) de la recta de exactitud, siendo ésta una estimación de la precisión intermedia del método de análisis. Cuanto más alta sea la  $s_{yx}$ , menos preciso será el procedimiento [15].

Tanto en la recta de exactitud del E-120 como en la del E-127, los tests de hipótesis para la pendiente y la ordenada en el origen tienen un p-valor mayor de 0,05, por lo que las hipótesis nulas no se pueden rechazar a un nivel de confianza del 95%. Se concluye, por tanto, que los métodos de análisis propuestos son veraces para ambos colorantes. Por otro lado, la precisión intermedia del método de análisis es de 0,1537 mg/L para el colorante E-120, y para el E-127 es de 0,0585 mg/L.

Tabla 12. Precisión intermedia, límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y capacidad de detección ( $CC\beta$ ) para los colorantes E-120 y E-127 (probabilidad de falso positivo y falso negativo del 5%).

Colorante	E-120	E-127
Línea de exactitud	$C_{pred} = 0,0218 + 0,9890 \cdot C_{real}$	$C_{pred} = 0,0024 + 0,9988 \cdot C_{real}$
Coefficiente de correlación	0,9945	0,9994
Precisión intermedia ( $s_{yx}$ )	0,1537	0,0585
$CC\alpha$ (mg/L)	0,2814	0,0939
$CC\beta$ (mg/L)	0,5569	0,1859



### 6.3.2. Límite de decisión y capacidad de detección

A partir de la recta de exactitud se puede calcular el límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC\beta$ ). El límite de decisión, o  $CC\alpha$ , se define como “el límite en el cual y a partir de cual se puede concluir con una probabilidad de error alfa que una muestra no es conforme”. Y la capacidad de detección, o  $CC\beta$ , se define como “el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error  $\beta$ ” [15]. La Tabla 12 muestra los valores de encontrados para estas dos figuras de mérito. El límite de decisión estimado para el E-120 es de 0,28 mg/L, lo que supone 7,04 mg/kg de cereza, mientras que para el E-127 es de 0,09 mg/L, lo que supone 2,35 mg/kg de cereza. Como ya se había indicado anteriormente, el método de análisis es más sensible para el E-127.

### 6.3.3. Recuperación

La recuperación se define como “el porcentaje real de una sustancia recuperada durante el proceso analítico” [15] y permite evaluar la eficiencia del procedimiento de extracción. Para ello se parte de dos muestras iguales, enriqueciendo una de ellas con una cantidad conocida de colorante. Una vez llevada a cabo la extracción de los colorantes en cada una de ellas, con la mezcla extractante óptima durante 50 minutos, y realizada la determinación de los mismos, se evalúa la recuperación según se indica en la Ecuación (5).

$$\% \text{ recuperado} = \frac{C_{\text{enriquecida}} - C_{\text{real}}}{C_{\text{añadida}}} \times 100 \quad (5)$$

La recuperación estimada para el E-120 es del 76%, mientras que para el E-127 es del 41%. La diferencia en estos porcentajes se explica por el hecho de que con la mezcla extractante óptima utilizada se obtenían mayores rendimientos para E-120.

### 6.4. Determinación de colorantes en muestras problema

Con el modelo de regresión de componentes principales ajustado en el apartado 6.2.2 se llevó a cabo la determinación de los colorantes E-120 y E-127 en cerezas de cóctel de 4 marcas comerciales. En este caso, las muestras se han sometido a un período de extracción con ultrasonidos de 50 minutos, para favorecer una mayor eficiencia en el proceso de extracción sólido-líquido.

Se calculó la cantidad extraída de los colorantes mediante la regresión multivariante y, teniendo en cuenta la recuperación del procedimiento de extracción, se obtiene la concentración final. Como se puede ver en la Tabla (13), las muestras de los productos 1 y 2 contenían ambos colorantes, dando valores muy por debajo de la concentración máxima que la reglamentación vigente establece en este tipo de alimentos, 200 mg/kg. El producto 3, según su etiquetado, sólo contenía E-127, y la concentración predicha para el colorante E-120 fue cero. Por último, en las muestras del producto 4, que sólo contenían E-129, se obtuvieron valores predichos distintos de cero para el E-120 y el E-127, sin embargo, los valores de *leverages* de estas muestras eran muy altos en comparación con los del resto de productos, por lo que se puede concluir que el modelo no era aplicable a estas muestras. Esto es lógico porque el colorante E-129 no se había incluido en el conjunto de calibración y, por tanto, no está modelado.

Tabla 13. Concentraciones calculadas de los colorantes en el extracto y en el producto.

<b>Muestra</b>	<b>E-120 en extracto (mg/L)</b>	<b>E-120 en producto (mg/kg)</b>	<b>E-127 en extracto (mg/L)</b>	<b>E-127 en producto (mg/kg)</b>
<b>Producto 1</b>	0,79	26,01	1,41	85,23
<b>Producto 2</b>	1,72	56,52	1,95	117,58
<b>Producto 3</b>	-	-	1,07	64,53
<b>Producto 4</b>	-	-	-	-

## 7. Conclusiones

Se han observado diferencias en las señales espectrales del E-120 y del E-127 en los disolventes puros (agua, etanol y acetona). Sin embargo, mezclas binarias y ternarias de los mismos, considerando algunas restricciones, proporcionan espectros similares en cuanto a posición y magnitud de las bandas.

La metodología de diseño experimental de mezclas permite obtener como medio extractante óptimo para el colorante E-127, una mezcla ternaria formada por 32% de etanol, 30% de agua y 38% de acetona. La misma metodología, aplicada al colorante E-120, condujo a una mezcla óptima de 50% de agua y 50% de acetona.

La función de deseabilidad ha llevado a una mezcla óptima para la extracción simultánea de E-120 y E-127 en cerezas de cóctel constituida por 38% de agua, 55% de acetona y 7% de etanol.

La validación del procedimiento analítico permite concluir que el método es veraz, con precisiones intermedias de 0,15 mg/L y 0,06 mg/L para E-120 y E-127, respectivamente. Los valores de  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  alcanzados fueron de 0,28 mg/L y 0,56 mg/L para el E-120, y de 0,09 mg/L y 0,19 mg/L para el E-127, respectivamente. La recuperación del procedimiento de extracción fue del 41% para el E-120 y de 75% para el E-127.

La regresión de componentes principales ha permitido resolver el problema de falta de selectividad debido a que las señales espectrales están solapadas.

Los valores de concentración encontrados para el E-127 y E-120 en las muestras comerciales analizadas no superan en ningún caso el límite máximo para estos colorantes en este tipo de producto (200 mg/kg).

## 8. Bibliografía

- [1] Núñez, M., Navarro, C. (2013). Guía completa de aditivos alimentarios. Barcelona: RBA.
- [2] Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios. DOUE 354 del 31/12/2008, 16-33.
- [3] Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión por el que se modifica el anexo II del Reglamento (UE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. DOUE 295 del 12/11/2011, 1-177.
- [4] Barros, C. (2009). Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso. 2ª ed. Madrid: Visión Libros.
- [5] Wissgott, U. (1984). Procedimiento para colorear artificialmente la fruta. Patente nº 528635. Registro de la propiedad industrial. España.
- [6] Scotter, M.J. (2011). Los métodos para la determinación de colorantes naturales permitidos en la Unión Europea: una revisión. *Aditivos alimentarios y contaminantes*, 28(5), 527-596.
- [7] Rovina, K., Siddiquee, S., Shaarani, S.M. (2017). A Review of Extraction and Analytical Methods for the Determination of Tartrazine (E 102) in Foodstuffs, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47(4), 309-324.
- [8] Voinovich, D., Campisi, B., Phan-Tan-Luu, R. (2009). Experimental Design for Mixture Studies, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol.1, 17-76. Oxford: Elsevier.
- [9] Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.
- [10] Stone, M., Brooks, R.J., Stone, M. (1990) 'Continuum Regression: Cross-Validated Sequentially Constructed Prediction Embracing Ordinary Least Squares, Partial Least Squares and Principal Components Regression', *Journal of the Royal Statistical Society*, 52 (2), 237-269.
- [11] Statgraphics Centurion XVII (2014). StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA.
- [12] Mathieu, D., Nony, J., Phan-Tan-Luu, R. (2007). NemrodW (Versión 2007\_03), L.P.R.A.I, Marsella.
- [13] Sarabia, L., Ortiz, M.C. (1994). DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13, 1-6.
- [14] Revilla, C. (2017). Determinación de eritrosina en cerezas de cóctel por espectrofotometría de absorción molecular mediante calibración univariante y multivariante. Trabajo fin de grado. Burgos: Universidad de Burgos. <http://hdl.handle.net/10259/4602>
- [15] Decisión de la Comisión, nº 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial* nº L 221 de 17/08/2002 8-36.