



UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Área de Química Analítica

Julio 2017

**DETERMINACIÓN DE ERITROSINA EN CEREZAS
DE CÓCTEL POR ESPECTROFOTOMETRÍA
DE ABSORCIÓN MOLECULAR MEDIANTE
CALIBRACIÓN UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE**

Clara Revilla Velasco

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Celia Reguera Alonso

ÍNDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. OBJECTIVES	2
3. INTRODUCCIÓN	2
4. REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES	5
5. REACTIVOS, PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL E INSTRUMENTACIÓN	5
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
6.1 Influencia del pH sobre las señales espectrales del E 127 y del E 120.....	7
6.2 Efecto del porcentaje de etanol en la extracción de E 127 en cerezas de cóctel .	8
6.3 Estudio del efecto matriz en la determinación de E 127 en cerezas de cóctel ...	11
6.4 Determinación de E 127 en cerezas de cóctel	12
6.4.1 Aproximación univariante.....	12
6.4.2 Análisis multivariante	13
6.4.3 Validación de los métodos de análisis.....	18
7. CONCLUSIONES	19
8. BIBLIOGRAFÍA.....	20

1. RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

La eritrosina (E 127) es un colorante sintético cuyo uso como aditivo alimentario está limitado a cerezas de cóctel, estableciéndose un límite máximo de 200 mg/kg. En este trabajo, la determinación de E 127 en cerezas de cóctel se lleva a cabo por espectrofotometría de absorción molecular UV-visible. Se estudia la extracción sólido-líquido del colorante utilizando diferentes mezclas de etanol-agua mediante un análisis de la varianza (ANOVA).

En cerezas que únicamente presentan el colorante E 127, su determinación se lleva a cabo mediante calibración en disolvente y por adición estándar. Sin embargo, si además contienen otros colorantes como el E 120, se aplica calibración multivariante para determinar la concentración de todos los colorantes presentes. Además, se estudia la influencia del pH sobre el espectro de absorción de los colorantes mencionados anteriormente. Y se validan los métodos de análisis desarrollados a través de su veracidad, efecto matriz, límite de decisión y capacidad de detección.

ABSTRACT

Erythrosine (E 127) is a synthetic colour exclusively authorized for use as food additive in cocktail cherries, which is subjected to a limit of 200 mg/kg. In this work, the determination of E 127 in cocktail cherries is performed through UV-Visible molecular absorption spectrophotometry. The extraction of the colour by means of solid-liquid extraction with different water-ethanol mixtures is studied by means of an analysis of variance (ANOVA).

A univariate approach is performed for determining E 127 in the absence of other colours; both the usual calibration and the standard addition methods are used. In addition, a multivariate approach is applied to determine E 127 in cocktail cherries that also contain carminic acid (E 120). Also, the dependence of spectrum of the colours with pH is studied. The methods of analysis developed are validated; accuracy, matrix effect, decision limit and capability of detection are established.

2. OBJECTIVES

The present work aims to:

- Study the effect of pH on the spectral signals of E 127 and E 120 colours.
- Analyse the effect of different water-ethanol mixtures on the extraction of E 127 from cocktail cherries.
- Assess the matrix effect of the different components of the cocktail cherries on the determination of E 127 by means of UV-Visible molecular absorption spectrophotometry.
- Determine E 127 in cocktail cherries both in the presence and in the absence of other colours, using the calibration techniques required in each case.
- Validate the analytical methods performed and detect the presence of outliers.
- Check the compliance with the existing legislation.

3. INTRODUCCIÓN

El color es la primera cualidad organoléptica por la que se juzga a un alimento. Por este motivo, la industria alimentaria se preocupa constantemente por mejorar el aspecto del producto, haciendo que sea más atractivo. Los colorantes forman parte de los aditivos alimentarios, siendo sustancias que se añaden intencionadamente con la única finalidad de aportar color. Con ellos se logra corregir la variabilidad tanto de la materia prima como del procesado, y conseguir así uniformidad en la fabricación. Desde el punto de vista de la nutrición, son totalmente prescindibles [1].

En cuanto a la legislación que afecta a los colorantes, el *Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios* [2] incluye las normas de utilización para asegurar un elevado nivel de protección de la salud y de los consumidores. A estos efectos, el presente Reglamento establece listas comunitarias de aditivos alimentarios autorizados, que figuran en los anexos II y III, y una serie de condiciones de utilización de los aditivos alimentarios en los alimentos, así como normas para su etiquetado. La lista de colorantes autorizados ha sido modificada posteriormente por el *Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011* [3].

Los colorantes se pueden clasificar en naturales o sintéticos. Se consideran naturales aquellos de origen animal, mineral o vegetal y, por lo general, son delicados e inestables. Por el contrario, los colorantes sintéticos son más estables, baratos, brillantes y ofrecen una gama de tonalidad más completa. Además, suelen ser solubles en agua y resistentes a altas temperaturas y a valores extremos de pH. Sin embargo, muestran mayores problemas de toxicidad por lo que se encuentran constantemente en estudio [4]. Estos colorantes sintéticos se emplean en aquellos casos en los que los naturales no logran aportar suficiente color o estabilidad durante el procesado o almacenamiento. Surgieron a mediados del siglo XIX, cuando William Perkin sintetizó la primera molécula

orgánica con propiedades colorantes, la mauveína. A partir de ese momento, los colorantes de origen artificial invadieron la industria alimentaria [5].

Dentro de los colorantes sintéticos se encuentra la eritrosina (E 127), colorante rojo rosáceo formado por cuatro átomos de yodo en su molécula y perteneciente al grupo de los xantenos. Su estructura completa se muestra en la *Figura 1*. El principal inconveniente tecnológico es su sensibilidad a la acción de la luz. En principio es poco absorbible, sin embargo, si se degrada, se libera el yodo contenido pudiendo provocar problemas de tiroides en el consumidor. Por ello, a pesar de haber sido el colorante alimentario más popular en los postres lácteos con aroma de fresa, hoy en día únicamente está permitido en las cerezas de cóctel, siendo muy eficaz ya que se fija a ellas y no destiñe. Además, numerosos estudios han relacionado su consumo con el déficit de atención en niños, la inhibición de la pepsina y su comportamiento como un xenoestrógeno. Por todas estas razones, su ingesta diaria admisible (IDA) ha sido fijada por la EFSA en 0,1 mg/kg de masa corporal [6] y únicamente está permitido en cerezas de cóctel o confitadas, estableciéndose una dosis máxima de 200 mg/kg de producto [3].

En la producción de estas cerezas de cóctel, la fruta se somete primero a una decoloración y, posteriormente, a una coloración artificial. Esto supone que el producto únicamente contiene los colorantes que aparecen en su etiqueta, y en las concentraciones fijadas en su elaboración.

Inmediatamente después de realizarse la cosecha de las cerezas, se sumergen en una disolución de SO₂ que permite prolongar su conservación. Este medio proporciona un color blanquecino a la fruta, eliminando la coloración natural de las cerezas debida a sus propios pigmentos de antocianina.

Una vez desulfatadas, se introducen en un medio acuoso que se calienta por encima de 90°C. Una vez alcanzada esta temperatura, se añade el colorante y sal de calcio comestible. Esta mezcla se mantiene en contacto durante unos 30 minutos. Con la sal se logra la fijación del colorante a las cerezas, permitiendo únicamente la penetración de la cantidad deseada y evitando su migración al medio exterior.

Transcurrido este tiempo, se añade ácido cítrico para reducir el pH hasta valores en los que el pigmento sea insoluble. Se esperan otros 30 minutos y se añade hidróxido de sodio gradualmente hasta alcanzar un pH en torno a 6.

Por último, se extraen las cerezas del medio acuoso y se aclaran con agua fría. Con este proceso, se consiguen cerezas con un atractivo color rojo, uniforme en todas ellas, y que no migra [7].

Por otra parte, el ácido carmínico (E 120) es un pigmento rojo natural que se obtiene por desecación y pulverización de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), un pequeño insecto que habita en los cactus, que se agarra fuertemente al alimento y no se desprende hasta que muere. Se emplea tanto en alimentación como en cosmética. Se puede diferenciar entre el colorante puro (E 120), cuya estructura se muestra en la *Figura 1*, y su extracto (E 120ii), el cual contiene alrededor del 20% de ácido carmínico. Se considera relativamente inocuo, no es tóxico ni cancerígeno, pero puede causar alergias debido a las impurezas [8]. A pesar de tener un origen natural, en legislación pertenece al conjunto de los colorantes alimentarios con límites máximos establecidos. Dentro del grupo de las frutas y hortalizas en conserva, se establece una dosis máxima de 200

mg/kg, siendo éste el límite para la combinación de E 120, E 122, E 124, E 129, E 131 y E 133 en este tipo de alimentos [3].

El rojo allura AC (E 129), cuya estructura química aparece en la *Figura 1*, es un colorante de origen sintético perteneciente al grupo de los azoicos. Se trata de una sal muy soluble en agua y de color rojo oscuro. Entre los efectos secundarios destaca la capacidad de dañar el DNA a dosis bajas y de producir trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) en niños [4]. Se incluye dentro de los colorantes alimentarios con dosis máximas permitidas. Como ya se ha mencionado anteriormente, las conservas de frutos rojos presentan un límite de 200 mg/kg de la combinación de E 129, E 120, E 122, E 124, E 131 y E 133 [3]. Los alimentos que contengan este colorante deben incluir en su etiquetado la declaración “puede tener efectos negativos sobre la actividad y la atención de los niños” [2].

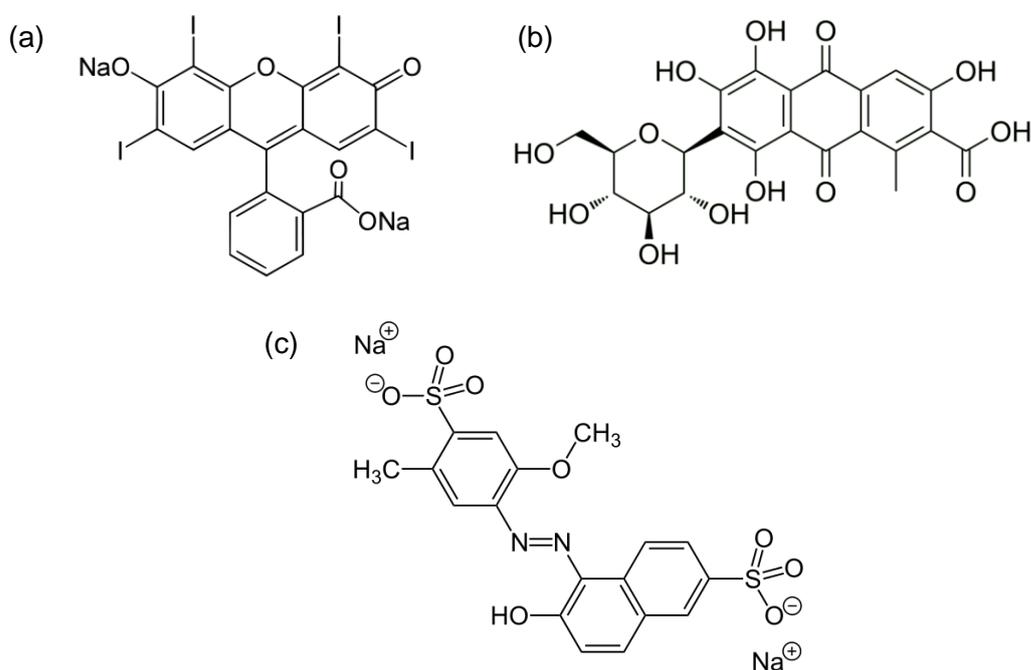


Figura 1. Estructura química de los colorantes E 127 (a), E 120 (b) y E 129 (c).

Para la determinación de colorantes alimentarios, tanto naturales como artificiales, se emplean diversos métodos de análisis como espectrofotometría molecular [9-11], técnicas electroanalíticas [12], cromatografía [13,14] o electroforesis capilar [15,16], entre otros. Debido a su rapidez, sencillez y bajo coste, las más utilizadas son la cromatografía en capa fina [17,18] y la espectrofotometría.

Sin embargo, estas técnicas pueden presentar limitaciones cuando se aplican a mezclas de varios colorantes. En estos casos, se pueden emplear varios métodos en tándem, como por ejemplo la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada con un detector de diodos [19,20] o la cromatografía líquida junto con espectrometría de masas [21,22].

También se puede recurrir a técnicas de análisis multivariante, como la regresión por mínimos cuadrados parciales que se explica en el epígrafe siguiente.

4. REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se puede emplear en aquellos casos en los que las señales espectrales de varios analitos aparecen solapadas, es decir, cuando no existen señales selectivas. En esta situación, la solución no se puede abordar mediante un análisis univariante y se requiere una metodología multivariante en la que se considere todo el espectro y no una única longitud de onda.

Esta técnica de regresión se basa en construir variables latentes utilizando múltiples variables predictoras. Estas nuevas variables se obtienen mediante combinaciones lineales de las variables originales, buscando direcciones de máxima variabilidad en el espacio de las variables predictoras, pero evitando aquellas direcciones no relacionadas con la respuesta [23]. Es decir, PLS transforma el espacio multidimensional definido por los datos originales en un espacio con menor dimensionalidad.

Los coeficientes que conforman estas combinaciones lineales se denominan *pesos*. Cuando se trata de señales espectrales, como en el presente trabajo, éstos dan una idea sobre las zonas del espectro, relacionadas con uno u otro colorante, que más influyen en las distintas variables latentes. Las nuevas coordenadas de cada muestra se denominan *puntuaciones*.

El número de variables latentes que constituyen el modelo de regresión, limitado por el número de muestras y/o de variables originales, se determina mediante la técnica de validación cruzada. Ésta consiste en predecir la respuesta de una o más muestras mediante un modelo PLS ajustado con las restantes. Esta operación se repite para todas las muestras, y son las mejores predicciones las que indican el número óptimo de variables latentes a tener en cuenta. La validación cruzada se denomina *leave-one-out* si únicamente se deja una muestra fuera cada vez, y se predice con el modelo construido con las restantes. De esta manera, todas las muestras son predichas al menos una vez.

Para la detección de datos anómalos en las variables predictoras se pueden utilizar los índices Q y T² de Hotelling. El índice Q o *suma de cuadrados residual* indica el residuo ortogonal de cada muestra al espacio definido por las variables latentes consideradas, mientras que la T² de Hotelling señala la distancia al centroide del espacio multidimensional. Una muestra se considera anómala, con un nivel de confianza determinado, si los valores de ambos índices superan simultáneamente los valores críticos correspondientes.

Asimismo, se pueden analizar los residuos estudentizados, los cuales dan una idea de la diferencia entre las respuestas reales y las calculadas por el modelo de regresión. Por provenir de una distribución normal con varianza uno, deben variar entre ciertos valores umbral, normalmente entre 2,5 y -2,5.

5. REACTIVOS, PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL E INSTRUMENTACIÓN

En el estudio del pH se emplea ácido clorhídrico 37% p/v (*Prolabo*), a partir del cual se prepara una disolución 0,01 M, al igual que con el hidróxido de sodio (*J. T. Baker*). En la etapa de extracción se utiliza etanol 96% v/v (*Panreac*) y, posteriormente, una solución acético-acetato preparada a partir de ácido acético 2 M (*Prolabo*) y acetato de sodio 2 M (*Prolabo*), empleada como solución tampón de pH 5,5.

Para las muestras de calibrado de eritrosina (*Merck* con una pureza mayor al 80%) y ácido carmínico (*Sigma-Aldrich*), se preparan disoluciones madre de estos colorantes en agua de 50 y 100 mg/L, respectivamente. Mediante diluciones se obtienen el resto de patrones necesarios.

Estos patrones se preparan en matraces de 10 mL, añadiendo el volumen necesario de disolución madre y 4 mL de etanol-agua (50:50, v/v), completando después el volumen con agua. En el caso del análisis multivariante, se añaden también 4 mL de la disolución tampón y después se enrasa con agua.

En cuanto a las muestras problema, a lo largo de todo el estudio se han utilizado cerezas de cóctel de tres marcas diferentes:

- *Bebé*: cerezas confitadas extra. En su etiquetado aparece el colorante E 127.
- *Helios*: cerezas en almíbar denso. Contiene los colorantes E 127 y E 120.
- *Videca*: cerezas deshuesadas en almíbar denso. Entre sus ingredientes se encuentra el colorante E 129.

Para realizar la extracción de los colorantes, se trituran las cerezas empleando un molino de cuchillas (velocidad de rotación: 10000 rpm), como aparece en la *Figura 2*. Se toman 3 g de la muestra triturada, se añaden 30 mL de extractante, y se lleva a cabo la extracción durante 5 minutos en ultrasonidos. Por último, se filtra utilizando un embudo y papel de filtro.



Figura 2. Trituración de las cerezas empleando un molino de cuchillas.

Las medidas espectrofotométricas se han realizado con un espectrofotómetro UV visible *Cary 50 Conc de Varian*. Se toman datos de absorbancia cada 2 nm entre longitudes de onda de 400 y 800 nm (visible). Por otra parte, los valores de pH se miden empleando un pHmetro *HANNA*.

Para el tratamiento de los datos obtenidos, se emplean tres programas informáticos diferentes: *Statgraphics*, *Detarchi* y *Matlab*. Con *Statgraphics* [24] se realizan los ajustes de las rectas lineales, la verificación de los diferentes test de hipótesis, el análisis de la varianza (ANOVA) y la determinación por mínimos cuadrados parciales. Con *Matlab* [25] se lleva a cabo la detección de datos anómalos en los métodos de análisis. Y, por último, con *Detarchi* [26] se calculan el límite de decisión y la capacidad de detección.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Influencia del pH sobre las señales espectrales del E 127 y del E 120

En primer lugar se analiza la influencia del pH sobre el espectro de los colorantes en estudio. Para disponer de un amplio rango de valores de pH, a alícuotas de 10 mL de una muestra patrón de 5 mg/L de E 127 y otra de 10 mg/L de E 120 se añaden pequeños volúmenes de NaOH y HCl, y se registran sus espectros. Concretamente, se añaden 50, 100 y 600 μ L de HCl para los valores de pH ácidos, y 0,1, 1 y 4 mL de NaOH para alcanzar los pH más altos.

El pH natural de una disolución acuosa de E 127 es de 5,95, y se ha indicado en la *Figura 3* como pH inicial. Los espectros obtenidos a los distintos pH considerados se muestran en la *Figura 3*, donde se observa que por debajo de pH 3,25 no se aprecia un máximo de absorción bien definido. A partir de ese pH, el máximo de absorción se sitúa en torno a 530 nm, aproximadamente. En ese punto, la absorbancia aumenta junto con el pH, llegando a un valor de absorbancia más o menos estable a partir de un pH en torno a 6.

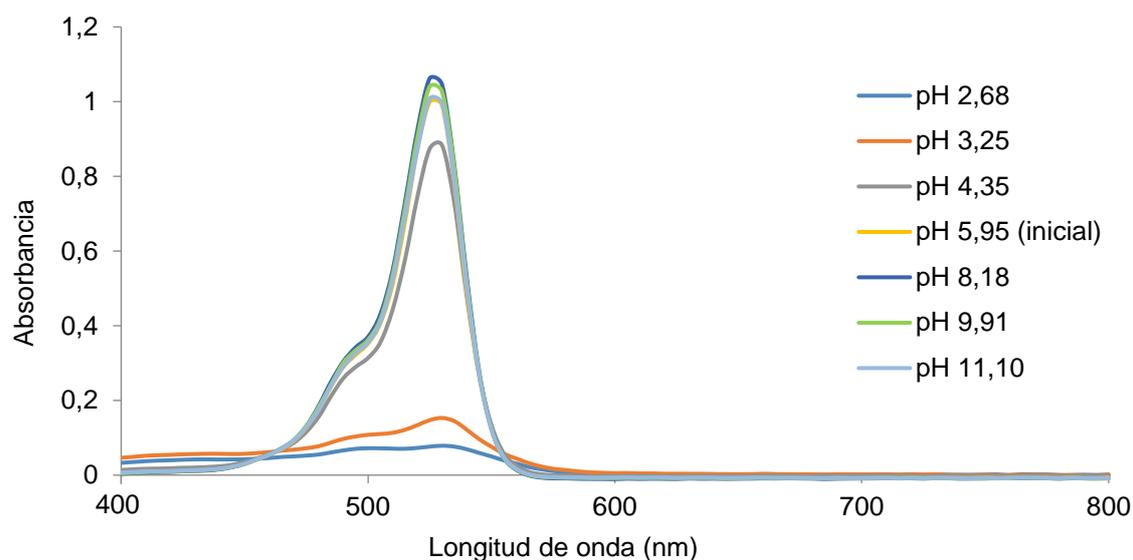


Figura 3. Espectros de absorción molecular de una disolución acuosa de E 127 a distintos valores de pH.

En el caso del colorante E 120, como aparece en la *Figura 4*, el espectro de absorción se modifica íntegramente en función del pH, siendo la absorbancia mayor a valores de pH altos. Para valores de pH ácidos, inferiores a 5, el espectro muestra un máximo de absorbancia que se encuentra a una longitud de onda ligeramente por debajo de 500 nm.

A medida que aumenta el pH, a valores superiores al inicial, el espectro cambia notablemente ya que se aprecian dos máximos de absorción, cuyas longitudes de onda se desplazan hacia la derecha a medida que aumenta el pH de la disolución.

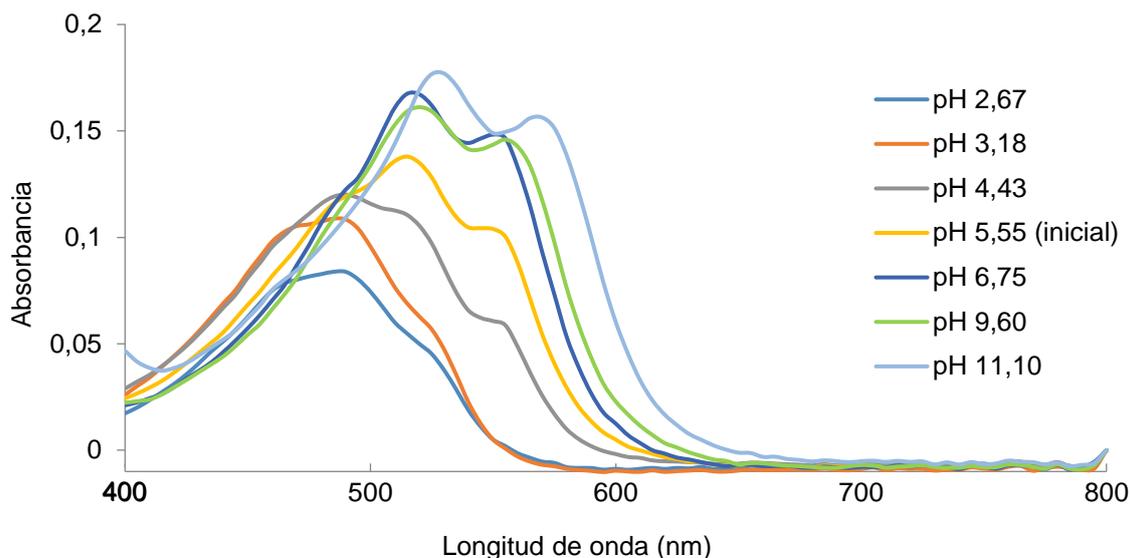


Figura 4. Espectros de absorción molecular de una disolución acuosa de E 120 a distintos valores de pH.

Estas variaciones observadas en los espectros registrados se corresponden con las distintas tonalidades que se pueden ver a simple vista, como se aprecia en la Figura 5.

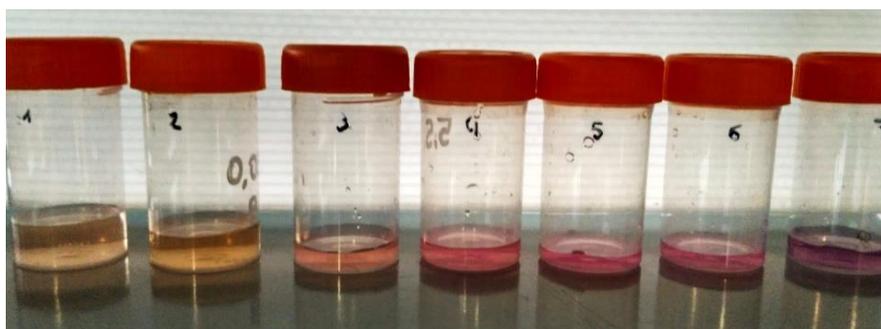


Figura 5. Coloración de distintas disoluciones acuosas de E 120 según su pH. De izquierda a derecha, pH creciente.

El estudio de la influencia del pH sobre las señales espectrales de ambos colorantes lleva a concluir que es necesario controlar el pH del medio, especialmente cuando se trate de determinar el E 120.

6.2 Efecto del porcentaje de etanol en la extracción de E 127 en cerezas de cóctel

En esta etapa del estudio se pretende optimizar el porcentaje de etanol en la extracción del colorante E 127 en cerezas de cóctel mediante el empleo de diferentes mezclas de etanol-agua como extractantes. Para ello, se preparan distintas mezclas de agua con un 10, 20, 30 y 50% de etanol en volumen. El proceso de extracción descrito en el apartado 5 se lleva a cabo sobre las cerezas de cóctel que solo contienen el colorante E 127 según el fabricante. El proceso de extracción se replica cinco veces con cada mezcla extractante sobre distintas porciones de muestra. Las disoluciones obtenidas aparecen en la Figura 6.



Figura 6. Extractos de cereza obtenidos con distintas mezclas extractantes. De izquierda a derecha, según el porcentaje de etanol contenido en el extracto: 0, 10, 20, 30 y 50%.

Se registra el espectro de los extractos obtenidos en cada caso, y se considera la absorbancia en el máximo de absorción. Los valores obtenidos se muestran en la *Tabla 1*. Con ellos se lleva a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor a cinco niveles (porcentaje de etanol en la mezcla de extracción) y cinco réplicas por nivel.

Tabla 1. Absorbancias máximas registradas en los extractos de cereza según el porcentaje de etanol contenido en el extractante.

0% EtOH	10% EtOH	20% EtOH	30% EtOH	50% EtOH
0,0398	0,0338	0,0578	0,2133	0,3558
0,0495	0,0304	0,0554	0,2245	0,3664
0,0373	0,0426	0,0418	0,1825	0,3557
0,0472	0,0342	0,0412	0,1725	0,3851
0,0348	0,0296	0,0439	0,1736	0,3499

En primer lugar es necesario comprobar que se cumplen las hipótesis previas de un ANOVA, es decir, que las varianzas por nivel son homogéneas y que los residuos del modelo de mínimos cuadrados subyacente siguen una distribución normal.

Para comprobar la homogeneidad de varianzas, se realizan los test de Cochran y Bartlett. En ambos test, la hipótesis nula es la misma, H_0 : las varianzas en cada nivel son iguales. Sin embargo, la hipótesis alternativa en el test de Cochran, H_a : al menos una de las varianzas es distinta, difiere de la correspondiente en el test de Bartlett, H_a : existen grupos de varianzas. Con los datos de la *Tabla 1*, se obtienen niveles de significación de 0,0085 y 0,0195 en los test de Cochran y Bartlett, respectivamente, por lo que, con un 95% de confianza, existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula. Por tanto, se aceptan las hipótesis alternativas y se concluye que no existe homogeneidad de varianzas. En el test de la F para comparar las desviaciones estándar de los niveles dos a dos, mostrado en la *Tabla 2*, se puede apreciar que las parejas de niveles en las que existe una diferencia estadísticamente significativa entre sus varianzas, por tener un nivel de significación menor de 0,05, incluyen siempre el

nivel correspondiente al 30% de etanol. Por lo tanto, se siguen analizando los datos eliminando este nivel, y se comprueba que de esta manera ya no falla la hipótesis de homogeneidad de varianzas. En este caso se obtienen niveles de significación de 0,0767 y 0,2305 en los test de Cochram y Bartlett, respectivamente. Al ser superiores a 0,05, se puede aceptar la hipótesis nula con un 95% de confianza y asegurar que existe homogeneidad de varianzas.

Tabla 2. Comparación por parejas de las desviaciones estándar de los niveles.

Comparación por niveles	F	Significación
0% EtOH / 10% EtOH	1,5199	0,6949
0% EtOH / 20% EtOH	0,6398	0,6758
0% EtOH / 30% EtOH	0,0699	0,0245
0% EtOH / 50% EtOH	0,2081	0,1576
10% EtOH / 20% EtOH	0,4209	0,4226
10% EtOH / 30% EtOH	0,0460	0,0113
10% EtOH / 50% EtOH	0,1369	0,0800
20% EtOH / 30% EtOH	0,1092	0,0544
20% EtOH / 50% EtOH	0,3253	0,3023
30% EtOH / 50% EtOH	2,9779	0,3156

Con este conjunto de datos se comprueba la normalidad de los residuos. Se realizan cuatro test de normalidad: Chi-Square, Shapiro-Wilk, Skewness y Kurtosis. En todos ellos la hipótesis nula es que los residuos siguen una distribución normal. Se obtienen niveles de significación mayores de 0,065, por lo que existen evidencias suficientes como para aceptar la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, los residuos siguen una distribución normal.

Una vez comprobado que las hipótesis previas se cumplen, se analizan los resultados obtenidos en el ANOVA, los cuales se muestran en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Resultados obtenidos en el ANOVA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Significación
Entre grupos	0,3876	3	0,1292	1592,62	0,0000
Intra grupos	0,0013	16	$8,11 \cdot 10^{-5}$		
Total (Corr.)	0,3889	19			

Como se observa en la *Tabla 3*, se obtiene un nivel de significación inferior a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, H_0 : no existe efecto debido al factor, y se concluye que el factor 'porcentaje de etanol' es significativo con un 95% de confianza. Esto implica que la absorbancia media obtenida en cada extracción no es estadísticamente igual, es decir, no se extrae la misma cantidad de colorante con cada mezcla extractante.

Para estudiar que niveles presentan medias significativamente diferentes a otros se realiza el test de rangos múltiples. Como se observa en la última columna de la *Tabla 4*, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en dicha columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una X en la misma columna, es decir, entre los niveles que implican 0 y 10% de etanol en el extractante, y los que implican 0 y 20% de etanol. Se puede concluir, con un riesgo de equivocación del 5%, que la absorbancia obtenida en el extracto y, por tanto, la cantidad de colorante extraído, es estadísticamente distinta y mayor en el caso del 50% de etanol que en el resto. Por este motivo, será la mezcla extractante elegida para realizar el resto del estudio.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el test de rangos múltiples.

Nivel	Casos	Media	Grupos homogéneos	
10% EtOH	5	0,0341	X	
0% EtOH	5	0,0417	X	X
20% EtOH	5	0,0481		X
50% EtOH	5	0,3626		X

Los resultados concluidos con el ANOVA corroboran la apariencia de los extractos obtenidos con las distintas mezclas de extracción, los cuales aparecen en la *Figura 6*. La absorbancia es mayor en las muestras extraídas con un 50% de etanol, obteniéndose extractos con mayor intensidad de color y, por lo tanto, mayor cantidad de E 127 extraído de las cerezas de cóctel.

6.3 Estudio del efecto matriz en la determinación de E 127 en cerezas de cóctel

Dado que la determinación del colorante E 127 se lleva a cabo en cerezas de cóctel y, al tratarse de una matriz compleja es posible que durante la extracción sólido-líquido también pasen al extracto otras sustancias que pueden interferir en el análisis, se estudia la posible existencia de efecto matriz.

Para ello, se realizan dos calibrados para el E 127 en un rango de concentraciones entre 0 y 4 mg/L. Uno de ellos se obtiene mediante diluciones adecuadas de la disolución madre, y el otro mediante adición estándar, para asegurar la presencia de los posibles interferentes. En este último caso, se añade un volumen de 4 mL de extracto a todos los patrones de calibrado. El extracto se obtiene de las cerezas de cóctel en cuyo etiquetado únicamente aparece reflejado como colorante el E 127. A continuación, se registran los espectros de los patrones de calibrado y se anotan las absorbancias a 526 nm para el calibrado en disolvente, y a 534 nm para el llevado a cabo mediante adición estándar.

Se ajustan los datos por mínimos cuadrados y los parámetros de las rectas de regresión, una vez comprobada la ausencia de datos anómalos, se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Parámetros de las rectas de regresión de los dos calibrados univariantes.

Tipo de calibrado	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación	S_{yx}
En disolvente	0,1070	-0,0018	0,9997	0,0037
Adición estándar	0,1062	0,0876	0,9989	0,0074

Para comprobar si existe efecto matriz se comparan las pendientes de los dos calibrados mediante el correspondiente test de hipótesis, cuya hipótesis nula es H₀: las pendientes son iguales. Al realizar el test, se obtiene un P-valor de 0,7063, superior a 0,05, por lo que no se tienen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula y se asegura, con un 95% de confianza, que las pendientes se pueden considerar estadísticamente iguales. Al considerarse las pendientes iguales, se concluye que no existe efecto matriz y que, por lo tanto, la concentración de E 127 en un extracto de cereza puede determinarse mediante un calibrado convencional en disolvente.

6.4 Determinación de E 127 en cerezas de cóctel

6.4.1 Aproximación univariante

La determinación univariante de E 127 en cerezas de cóctel se lleva a cabo a través de los dos calibrados construidos en el epígrafe 6.3. Los valores obtenidos aparecen recogidos en la *Tabla 6*. En dicha tabla, se muestran las concentraciones de colorante en el extracto y en las cerezas, así como los intervalos de confianza obtenidos para un nivel de significación del 5%.

Tabla 6. Concentraciones de E 127 determinadas en la muestra problema.

Tipo de calibrado	Concentración en extracto (mg/L)	Concentración en producto (mg/kg)	Intervalo de confianza (95%)
En disolvente	0,859	21,473	± 2,275
Adición estándar	0,872	21,805	± 4,555

Los resultados obtenidos en ambos casos son similares en cuanto a concentración de colorante en el producto. Sin embargo, el intervalo de confianza es más pequeño en el calibrado convencional en disolvente.

6.4.2 Análisis multivariante

A continuación se aborda el análisis de E 127 en cerezas de cóctel en cuyo etiquetado se especifica que contiene E 127 y E 120 como colorantes. En la *Figura 7* se muestran los espectros de los colorantes E 127 y E 120 junto con el de un extracto de cerezas que contiene ambos colorantes. Se observa que los espectros del E 127 y el E 120 se encuentran muy solapados, por lo que, en una mezcla de ambos colorantes, sería muy difícil saber qué parte de la señal se debe a cada uno de ellos. La metodología univariante utilizada anteriormente solo es válida para determinar E 127 en cerezas que únicamente contengan este colorante. Por lo tanto, no sería adecuada en este caso y hay que recurrir a una calibración multivariante mediante una regresión por mínimos cuadrados parciales.

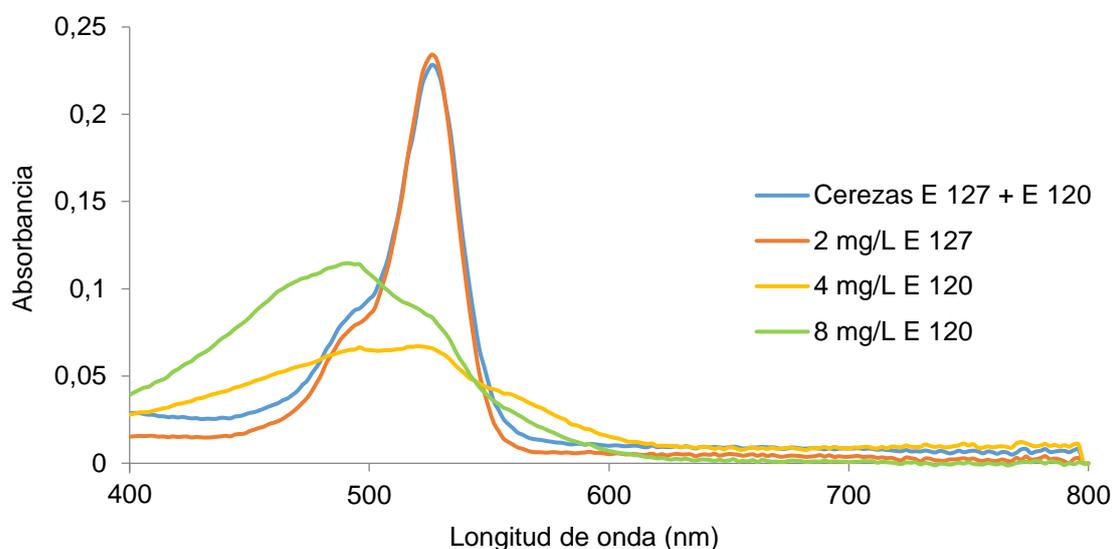


Figura 7. Espectros de absorción molecular de varias disoluciones acuosas.

Para ello se dispone de un conjunto de muestras, denominado conjunto de aprendizaje y compuesto por una serie de mezclas de los colorantes E 127 y E 120, cuyas concentraciones aparecen en la *Tabla 7*. Estos patrones se codifican con la letra P seguida de dos dígitos, el primero de ellos hace referencia a la concentración de E 127, y el segundo a la de E 120.

Y, por otro lado, se dispone de un conjunto test constituido por los extractos obtenidos a partir de las muestras problema indicadas en el apartado 5. Se consideran las tres marcas de cerezas de cóctel, cada una de las cuales se analiza por triplicado, llevándose a cabo la extracción y el registro posterior del espectro correspondiente. Las muestras test se codifican con una M seguida de dos dígitos. El primero hace referencia al tipo de cereza, siendo un 1 en el caso de las cerezas que solo contienen E 127 como colorante, un 2 en aquellas que contienen E 127 y E 120 y, por último, un 3 en las que contienen en su composición únicamente E 129. El segundo dígito hace referencia a la réplica.

Tabla 7. Concentraciones de ambos colorantes en las muestras preparadas para el calibrado multivariante.

Muestra	Concentración E 127 (mg/L)	Concentración E 120 (mg/L)
P00	0	0
P01	0	1
P02	0	2
P03	0	3
P04	0	4
P10	1	0
P11	1	1
P12	1	2
P13	1	3
P14	1	4
P20	2	0
P21	2	1
P22	2	2
P23	2	3
P24	2	4
P30	3	0
P31	3	1
P32	3	2
P33	3	3
P34	3	4
P40	4	0
P41	4	1
P42	4	2
P43	4	3
P44	4	4

Como ya se ha visto en el epígrafe 6.1 que el colorante E 120 es especialmente sensible al pH del medio, se tamponan todas las muestras. Esto es necesario ya que el carácter ácido del E 120 podría modificar el pH del medio y variar la forma del espectro registrado, lo que llevaría a obtener resultados erróneos. Se elige un pH próximo al pH natural de los extractos de las cerezas, por lo que se utiliza un tampón acético-acetato de pH 5,5.

Como variables predictoras se tienen en cuenta las absorbancias recogidas a longitudes de onda entre 400 y 650 nm, tomadas cada 2 nm, por lo que se tiene un total de 126 variables. De esta manera, la matriz de datos del conjunto de aprendizaje posee 25 filas y 126 columnas. Con esto se construyen dos modelos de regresión PLS con las muestras del conjunto de aprendizaje para el colorante E 127 y para el E 120. Se emplea el método *leave-one-out* de validación cruzada con los datos autoescalados.

En la *Tabla 8* se muestra el modelo de regresión ajustado para el E 127 con distinto número de variables latentes. Se observa que el modelo construido con tres variables latentes explica el 99,67% de la varianza de la respuesta, porcentaje muy similar a la varianza explicada en predicción, lo que indica que se trata de un modelo muy estable y con una buena capacidad predictiva. La inclusión de una cuarta variable latente apenas incrementa la varianza explicada en la respuesta y en predicción, corriéndose el riesgo de sobreajustar el modelo.

Tabla 8. Porcentajes de varianza explicada por los modelos PLS para el E 127.

Variables latentes	Varianza explicada Bloque X (%)	Varianza explicada Bloque Y (%)	Varianza explicada en predicción (%)
1	68,34	62,80	55,24
2	95,69	98,17	96,26
3	99,70	99,67	98,90
4	99,83	99,86	99,27
5	99,92	99,91	99,62
6	99,94	99,96	99,65

Se realiza un estudio para comprobar la existencia de datos anómalos. Para ello, se valoran los índices Q y T^2 de Hotelling, así como la existencia de residuos estudentizados especialmente grandes. Una muestra se considera anómala si presenta un residuo estudentizado fuera del intervalo $\pm 2,5$ y/o unos índices de Q y T^2 de Hotelling que superen simultáneamente los valores umbral de ambos, estimados a un nivel de significación del 5%. Para poder visualizarlo gráficamente, se representan ambos índices, quedando los datos anómalos situados en la esquina superior derecha.

Se estudia la presencia de datos anómalos en el conjunto de aprendizaje, y como se aprecia en la *Figura 8*, ningún dato supera los valores umbral establecidos para los índices de Q y T^2 de Hotelling, ni tampoco el de los residuos estudentizados. Por lo tanto, este es el modelo elegido para determinar este colorante en las muestras de cerezas.

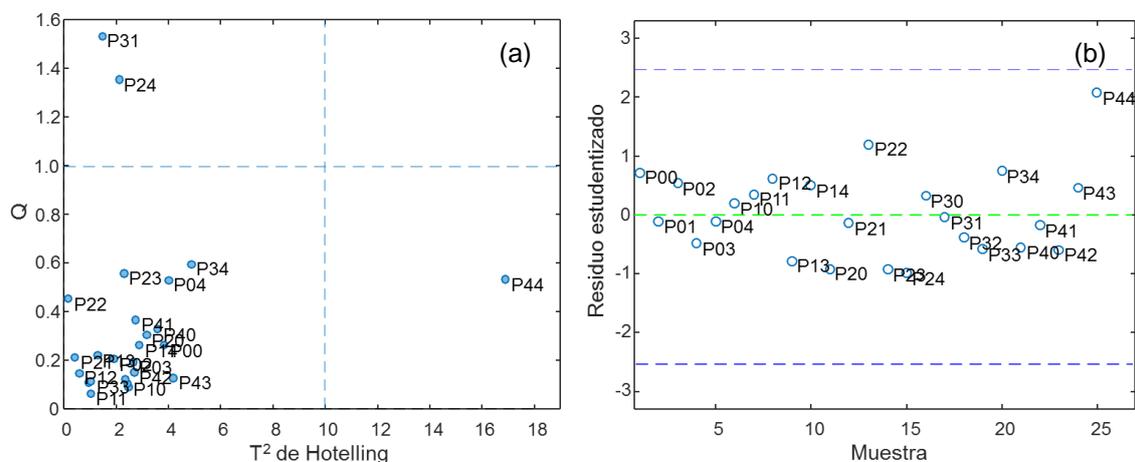


Figura 8. Índices Q y T^2 de Hotelling (a) (valores umbral estimados a un nivel de confianza del 95%) y residuos estudentizados (b) de los datos del conjunto de aprendizaje para el modelo PLS construido con todos los datos para el colorante E 127.

De forma análoga, se construye el modelo de regresión PLS para el E 120. Al igual que en el caso anterior, como se muestra en la *Tabla 9*, de los seis modelos calculados, se elige el compuesto por tres variables latentes ya que explica mayor porcentaje de varianza en predicción. En este caso, la inclusión de una cuarta variable latente disminuye la varianza explicada en predicción, por lo que no debe tenerse en cuenta.

Tabla 9. Porcentajes de varianza explicada por los modelos PLS para el E 120.

Variabes latentes	Varianza explicada Bloque X (%)	Varianza explicada Bloque Y (%)	Varianza explicada en predicción (%)
1	75,96	62,59	33,50
2	92,93	83,63	66,43
3	99,70	99,45	99,31
4	99,80	99,76	99,16
5	99,91	99,83	99,64
6	99,95	99,92	99,71

Para el colorante E 120, como se puede concluir a partir de la *Figura 9*, tampoco se detecta ningún dato anómalo dentro del conjunto de aprendizaje, por lo que el modelo PLS con tres variables latentes, el cual explica el 99,45% de la varianza de la respuesta, es el modelo final.

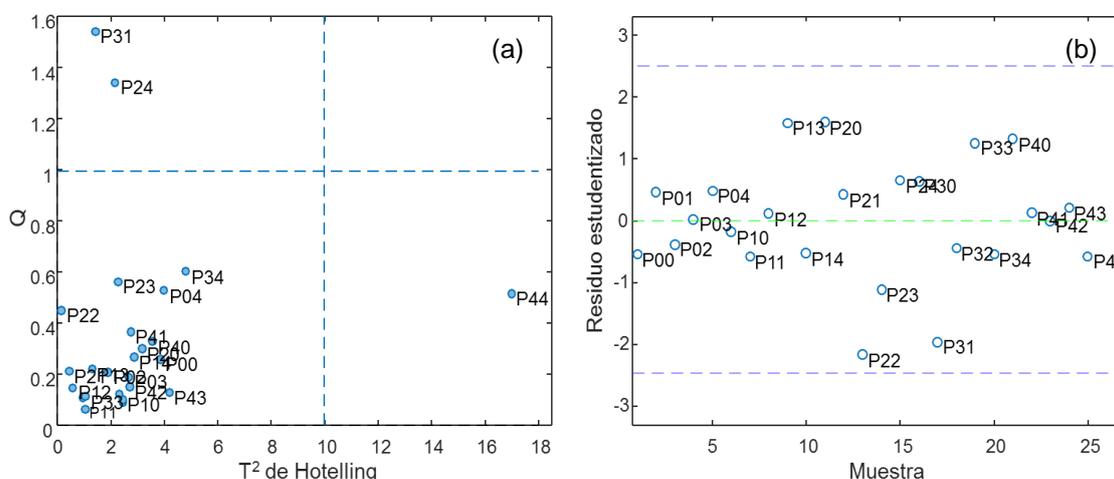


Figura 9. Índices Q y T² de Hotelling (a) (valores umbral estimados a un nivel de confianza del 95%) y residuos estandarizados (b) de los datos del conjunto de aprendizaje para el modelo PLS construido con todos los datos para el colorante E 120.

A continuación, se estudia la presencia de datos anómalos en el conjunto test. Únicamente las tres réplicas de las muestras con colorante E 129 (M3) aparecen como anómalas en los dos modelos PLS construidos, ya que presentan valores de Q y T² de Hotelling superiores al umbral, tal y como se muestra en la *Figura 10*. Con estas cerezas se pretende comprobar que el método es capaz de detectar algo ajeno a las muestras de calibración. Al ser datos anómalos, se concluye que, efectivamente, los modelos no son aplicables a las cerezas que presentan E 129, lo cual se corrobora con la diferencia de color que presenta frente a E 127 y E 120, como se puede apreciar en la *Figura 11*.

El resto de muestras del conjunto test, al igual que todo el conjunto de aprendizaje, no son anómalas.

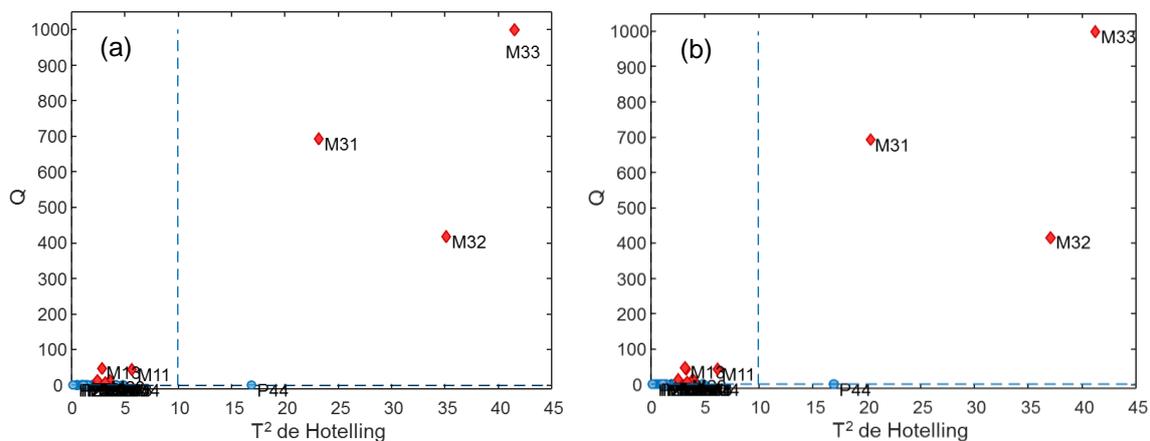


Figura 10. Índices Q y T^2 de Hotelling (valores umbral estimados a un nivel de confianza del 95%) de los modelos PLS construidos para los colorantes E 127 (a) y E 120 (b). Círculos azules: conjunto de aprendizaje. Rombos rojos: conjunto test.

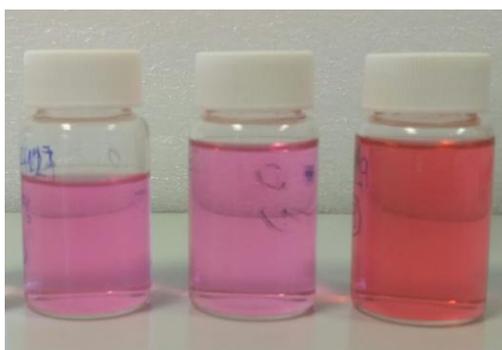


Figura 11. De izquierda a derecha, extracto de cerezas con E 127, E 127 + E 120, E 129.

Una vez detectados los datos anómalos, los modelos permiten predecir la concentración de los colorantes esperados en los extractos de cada muestra. Teniendo en cuenta las diluciones, se calcula la cantidad de E 127 y E 120 en las cerezas. Todo ello aparece reflejado en la *Tabla 10*.

La concentración estimada de E 120 puede no corresponderse con la total, ya que las condiciones de extracción elegidas pueden no ser las más adecuadas para dicho colorante.

Tabla 10. Concentraciones de E 127 y E 120 determinadas en las muestras problema.

Muestra	Concentración E 127 en extracto (mg/L)	Concentración E 120 en extracto (mg/L)	Concentración E 127 en producto (mg/kg)	Concentración E 120 en producto (mg/kg)
M11	1,224	-	30,609	-
M12	1,170	-	29,250	-
M13	1,152	-	28,796	-
M21	1,790	1,067	44,744	26,685
M22	1,766	1,098	44,144	27,463
M23	1,578	0,870	39,455	21,758

6.4.3 Validación de los métodos de análisis

Por último, se lleva a cabo la validación de los métodos de análisis mediante la estimación de algunas figuras de mérito. Concretamente, en este caso, se determinan la exactitud (en sus dos vertientes, veracidad y precisión), el límite de decisión y la capacidad de detección del método.

Se entiende por exactitud a “*la diferencia entre un resultado y el valor de referencia aceptado*”. Concretamente, la veracidad se define como “*el grado de coincidencia entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados del análisis y el valor de referencia aceptado*” [27]. Se evalúa a través de la recta de veracidad en la que se representa la concentración predicha por el modelo frente a la concentración real de los patrones. Un método se considera veraz si esta recta presenta una ordenada en el origen igual a cero y una pendiente igual a 1, lo cual se comprueba mediante los test de hipótesis correspondientes. La hipótesis nula para el test de la pendiente es que la pendiente es igual a uno. En el caso del test para la ordenada en el origen, la hipótesis nula es que la ordenada en el origen es 0.

La precisión se define como “*el grado de coincidencia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones prefijadas*” [27]. La desviación típica residual (s_{yx}) de la recta de veracidad se puede asimilar a la precisión del método de análisis en el rango de calibración.

La recta de veracidad permite calcular también el límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$). El límite de decisión se define como “*el valor de la concentración neta que conduce, para una probabilidad de error dado, α , a la decisión de que la concentración del analito en el material analizado es mayor que la del blanco*”. Mientras que la capacidad de detección es “*la verdadera concentración del analito en el material analizado que conduce, con probabilidad $1-\beta$, a la conclusión correcta de que la concentración en el material analizado es diferente de la del blanco analítico, para una probabilidad de falso positivo dada*” [28].

Los parámetros de las rectas de veracidad para el colorante E 127, teniendo en cuenta tanto la determinación univariante como la multivariante, y para el colorante E 120 se muestran en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Parámetros de las rectas de veracidad con los métodos de análisis propuestos.

Método de análisis	Colorante	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación	S _{yx}
Univariante	E 127	1,0000	6,09·10 ⁻⁹	0,9997	0,0345
Multivariante	E 127	0,9967	0,0065	0,9984	0,0842
	E 120	0,9945	0,0109	0,9973	0,1086

Para la recta de veracidad del método univariante, se obtiene un nivel de significación de 1 para el test de la pendiente, y de 0,9997 para el de la ordenada en el origen. Al ser ambos valores superiores a 0,05, no existen evidencias suficientes para rechazar las hipótesis nulas, por lo que el método se puede considerar veraz.

En el método multivariante, tanto para el colorante E 127 como para el E 120 se obtienen valores de significación superiores a 0,05. Por ello, se aceptan las hipótesis nulas, las cuales aseguran, con un 95% de confianza, que la pendiente es igual a 1 y el término independiente igual a 0, respectivamente. Por lo tanto, los métodos diseñados se consideran veraces.

Para el método univariante, se obtiene una precisión de 0,0349 mg/L, mientras que para el multivariante de 0,0842 mg/L para el E 127 y de 0,1086 mg/L para el E 120.

En el caso de CC α y CC β , los resultados obtenidos para estas dos figuras de mérito se muestran en la *Tabla 12*. Puede verse como, utilizando el método univariante es posible determinar desde 0,0798 mg/L de E 127, concentraciones inferiores a las del análisis multivariante, con una probabilidad de falso positivo y falso negativo iguales a 0,05.

Tabla 12. Valores obtenidos para la señal de detección, CC α y CC β en ambos métodos.

Método de análisis	Colorante	Señal de detección	CC α (mg/L)	CC β (mg/L)
Univariante	E 127	0,0403	0,0403	0,0798
Multivariante	E 127	0,1038	0,0976	0,1930
	E 120	0,1363	0,1261	0,2495

7. CONCLUSIONES

La variación de pH en los extractos de cerezas de cóctel que contienen los colorantes E 127 y E 120 influye tanto en la coloración de la solución resultante como en el espectro de absorción obtenido. Para el colorante E 127, esta influencia se aprecia, principalmente, en la magnitud de la absorción, obteniéndose valores más altos a pH por encima de 6. En el caso del E 120, el pH influye no solo en la aparición de uno o dos máximos de absorción, sino también en la posición de los mismos. Esto implica que

para llevar a cabo la determinación de estos colorantes en este tipo de muestras mediante espectroscopia de absorción molecular es necesario tamponar el medio.

El porcentaje de etanol en la mezcla de extracción del E 127 en cerezas de cóctel tiene efecto significativo en la absorbancia obtenida en los extractos y, por lo tanto, en la cantidad de colorante extraído. Se extrae mayor cantidad de E 127 de las cerezas cuando se incorpora un 50% de etanol en dicha mezcla.

Los componentes de las cerezas extraídos junto con el colorante de interés no ejercen efecto matriz sobre la señal analítica del E 127.

La determinación de E 127 en cerezas de cóctel que solo contienen este colorante se puede llevar a cabo mediante calibración univariante. La concentración obtenida es de 21,64 mg/kg, muy por debajo del límite establecido en la reglamentación para este colorante en este tipo de muestras.

En el caso de las cerezas que contienen los colorantes E 127 y E 120, su determinación se realiza mediante la regresión por mínimos cuadrados parciales. Se obtiene una concentración de 42,78 mg de E 127 y de 25,30 mg de E 120 por kilogramo de cerezas, ambos valores cumpliendo los límites establecidos por la legislación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Contento, A.M. (1997). *Nuevos métodos fotométricos y cromatográficos para la determinación de colorantes rojos en alimentos*. Volumen 49 de Tesis doctorales. Cuenca: Universidad de Castilla La Mancha.
- [2] Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios. DOUE 354 del 31/12/2008, pp.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, pp.1-177.
- [4] Núñez, M., Navarro, C. (2013). *Guía completa de aditivos alimentarios*. Barcelona: RBA.
- [5] Bello, J. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Madrid: Díaz de Santos, pp.179-186.
- [6] 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
- [7] Wissgott, U. (1984). *Procedimiento para colorear artificialmente la fruta*. Patente nº 528635. Registro de la propiedad industrial. España

- [8] Gil, A., Ruiz, M.D. (2010). *Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. 2ª ed. Madrid: Visión Libros.
- [9] Zalacain, A., Ordoudi, S.A., Blazquez, I., Díaz-Plaza, E.M., Carmona, M., Tsimidou, M.Z., Alonso, G.L. (2005). Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin. *Food additives and contaminants*, 22(7), pp.607-615.
- [10] Ordoudi, S.A., Tsimidou, M.Z. (2011). Consideration of fluorescence properties for the direct determination of erythrosine in saffron in the presence of other synthetic dyes. *Food additives and contaminants part A-Chemistry analysis control exposure & risk assessment*, 28(4), pp.417-422.
- [11] Guler, Z. (2005). Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in Turkey using UV/VIS spectrophotometry. *Journal of food quality*, 28(1), pp.98-108.
- [12] Yilmaz, U.T., Regun, F., Yilmaz, H. (2014). Determination of the food dye carmine in milk and candy products by differential pulse polarography. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), pp.329-335.
- [13] Petigara Harp, B., Miranda-Bermudez, E., Barrows, J.N. (2013). Determination of seven certified color additives in food products using liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(15), pp.3726-3736.
- [14] Martin, F., Oberson, J.M., Meschiari, M., Munari, C. (2016). Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food chemistry*, 197, pp.1249-1255.
- [15] Huang, H.Y., Chiu, C.W., Sue, S.L., Cheng, C.F. (2003). Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *Journal of chromatography A*, 995(1), pp.29-36.
- [16] Ryvolova, M., Taborsky, P., Vrabel, P., Krasensky, P., Preisler, J. (2007). Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography A*, 1141(2), pp.206-211.
- [17] Tand, T.X., Xu, X.J., Wang, D.M., Zhao, Z.M., Zhu, L.P., Yang, D.P. (2015). A rapid and green limit test method for five synthetic colorants in foods using polyamide thin-layer chromatography. *Food analytical methods*, 8(2), pp.459-466.
- [18] Baranowska, I., Zydron, M., Szczepanik, K. (2004). TLC in the analysis of food additives. *JPC-journal of planar chromatography-modern TLC*, 17(1), pp.54-57
- [19] Kirschbaum, J., Krause, C., Pfalzgraf, S., Brückner, H. (2003). Development and evaluation of an HPLC-DAD method for determination of synthetic food colorants. *Chromatographia*, 57, pp.115-119.

- [20] Karanikolopoulos, G., Gerakis, A., Papadopoulou, K., Mastrantoni, I. (2015). Determination of synthetic food colorants in fish products by an HPLC-DAD method. *Food chemistry*, 177, pp.197-203.
- [21] Tsai, C.F., Kuo, C.H., Shih, D.Y.C. (2015). Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of food and drug analysis*, 23(3), pp.453-462.
- [22] Amelin, V.G., Korotkov, A.I., Andoralov, A.M. (2017). Simultaneous determination of dyes of different classes in aquaculture products and spices using HPLC-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of analytical chemistry*, 72(2), pp.183-190.
- [23] Martens, H., Naes, T. (1989). *Multivariate calibration*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- [24] Statgraphics Centurion XVII (2014). StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA.
- [25] MATLAB versión 8.4.0.150421 (2014). The Mathworks, Inc., MA, USA.
- [26] Sarabia, L., Ortiz, M.C. (1994). *DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection*, *TrAC Trends Anal. Chem.* 13, 1-6.
- [27] International Standard Organization (1994). *ISO 5725, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. Ginebra.
- [28] International Standard Organization (1997). *ISO-11843-1, Capability of detection. Part 1: terms and definitions*. Ginebra.