



UNIVERSIDAD DE BURGOS

# Análisis y optimización de la extracción de colorantes azoicos en vino para la detección de fraudes

Grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos



Rebeca Martínez Martínez

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Susana Palmero Díaz



Co-funded by the  
Erasmus+ Programme  
of the European Union

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2. OBJECTIVES</b> .....	4
<b>3. TEORÍA</b> .....	4
3.1. Diseño de experimentos central compuesto .....	4
3.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales .....	5
<b>4. EXPERIMENTAL</b> .....	6
4.1. Disoluciones y reactivos .....	6
4.2. Materiales e instrumentación .....	6
4.3. Procedimiento experimental. ....	6
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	7
5.1 Ensayos previos .....	7
5.2 Optimización de la extracción de colorantes azoicos en vinos .....	8
5.2.1 Estudio del efecto de la cantidad de lana utilizada .....	8
5.2.2. Optimización de la cantidad de lana y del volumen de amoníaco .....	10
5.2.3. Optimización del volumen de agua para la reextracción .....	14
5.3 Determinación de colorantes en muestras de vino .....	15
5.3.1 Determinación cualitativa mediante cromatografía en capa fina .....	15
5.3.2. Determinación cuantitativa mediante espectrofotometría UV-Vis. ....	17
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	20
<b>7. ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	21
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	21

## **RESUMEN**

En este trabajo se pone a punto un método analítico para extraer y determinar colorantes alimentarios azoicos en vinos. La adición de colorantes alimentarios a los vinos no está permitida en la UE; la presencia de estos compuestos en un vino constituye un fraude. La extracción de E-123, E-124 y E-129 en vinos con lana, basada en el método Arata-Posseto, se optimiza utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y la metodología de diseño de experimentos. Posteriormente, se lleva a cabo el análisis cualitativo con cromatografía en capa fina (TLC). Asimismo, se aborda la determinación cuantitativa mediante espectrofotometría UV-Vis. y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

## **ABSTRACT**

An analytical method to extract and determine azoic food colorants in wines is developed in this work. Addition of food colorants to wines is not permitted in the EU; the presence of these compounds in a wine constitutes a fraud. The extraction of E-123, E-124 and E-129 from wines with wool, based on Arata-Posseto's method, is optimized by using analysis of variance (ANOVA) and experimental design methodology. The subsequent qualitative analysis with thin layer chromatography (TLC) is carried out. In addition, quantitative analysis by means of UV-Vis. spectrophotometry and partial least squares (PLS) regression is approached.

## 1. INTRODUCCIÓN

Colorante es un tipo de aditivo utilizado para dar color a un alimento o para que este recupere el color perdido, por ejemplo, por su proceso de elaboración.

El fraude producido en alimentos no es de ninguna manera un suceso actual, ya que se considera tan antiguo como la producción de alimentos. [1] Hace ya unos 1500 años antes de Cristo, los egipcios añadían colorantes naturales al vino para mejorar su aspecto. Con el transcurso de los años, el uso de colorantes fue amentando progresivamente, pero fue el siglo XIX el de mayor auge, con la creación de los colorantes sintéticos. [2]

Como las primeras falsificaciones alimentarias se observaron en los vinos, los ensayos iniciales de investigación para detectar colorantes artificiales se refieren a estos. Ya en año 1864, Blume descubrió que, si se empapaba una miga en vino, luego se exprimía, se dejaba secar y se sumergía en agua; el resultado final era que, si esta permanecía coloreada, el vino contenía colorantes artificiales. Gracias a este ensayo, en 1872 Bécham conseguía demostrar la adición de fucsina a un vino, y en 1876 Dupré proponía un método para la detección de colorantes artificiales, empleando diálisis. [3]

En la elaboración del vino, las adulteraciones o fraudes que se cometen son, principalmente, la adición de edulcorantes naturales o sintéticos, además de etanol, la dilución con agua, la adición de sustancias sintéticas para ocultar defectos del producto (como colorantes) y el uso de otros ingredientes. Como ejemplos de fraudes tanto históricos como actuales destacan:

- En el Imperio Romano se corregía el vino con sapa o saba (jugo de uva reducido a un tercio de su volumen original hirviendo el vino en un recipiente de plomo) esto permitía aumentar el dulzor del vino y su vida útil. El uso de este jarabe se extendió por toda Europa hasta el siglo XVII y causo graves envenenamientos por plomo, conocidos como *Colica Pictorum* (en Francia) y cólico Devonshire (en Inglaterra).
- En Francia, en el siglo XIX, se adulteraba el vino con yeso para aumentar su vida útil.
- A finales del siglo XIX se importada vino de Gran Bretaña a Cádiz para ser enviado de nuevo etiquetado como jerez de alta calidad.
- En Austria, se añadió dietilenglicol a vinos dulces, debido a una cosecha tardía, para aumentar su sabor dulce [4].

Los colorantes se dividen en naturales, que son obtenidos de productos naturales o de una síntesis a partir de estos; pueden ser de origen vegetal, como por ejemplo antocianos (E-163), carotenos (E-160a),..., o de origen animal, como el ácido carmínico, procedente de la cochinilla (E-120), y también existen colorantes artificiales que son los que se obtienen por síntesis química.[5] Dentro de los colorantes de síntesis (artificiales), destacan por su abundancia e importancia los colorantes azoicos, los cuales presentan en su estructura uno o más dobles enlaces nitrógeno-nitrógeno en asociación con uno o más sistemas aromáticos [6]. Según el Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011 no se permite la adición de colorantes alimentarios al vino. [7]

En la actualidad, la identidad y autenticidad de los productos son temas destinados a la ciencia y tecnología de los alimentos debido, principalmente, al interés de los

consumidores por lo que comen, y al de los productores por proteger la fiabilidad y calidad de sus marcas. Por lo tanto, los investigadores de alimentos se han dedicado al desarrollo de técnicas analíticas rápidas y precisas que permitan detectar la adulteración y el fraude en alimentos. [8]

La primera sensación que percibimos cuando observamos una copa de vino es precisamente el color. Este atributo le otorga la apariencia e invita, o no, a su consumo. En el caso del vino tinto, el color tiene todavía más relevancia; el espectro de absorción molecular en el UV-Vis. y el aspecto visual van cambiando con la edad. Por ejemplo, un vino tinto de 1 año presenta un máximo de absorción a 520 nm, correspondiente al color rojo, y una componente amarilla (420 nm) y una azul (620 nm) bastante importantes; es por esto que este vino presenta un color rojo con tonalidades violáceas. Sin embargo, un vino tinto de 5 años tiene una componente roja menor y una componente amarilla mayor, por lo que su color es rojo teja. Y cuando el vino alcanza los 20 años, ya presenta una componente roja muy pequeña y una componente amarilla relativamente más alta, su color se acerca al marrón. [9]

Estas variaciones de color son producidas por los compuestos fenólicos (divididos en no flavonoides y flavonoides). Los no flavonoides, que se dividen en ácidos fenólicos y estilbenos, no contribuyen de forma directa al color, pero pueden oxidarse dando lugar a tonalidades amarillas o marrones (responsables del color de los vinos blancos añejos). Los flavonoides se dividen en flavonoles, flavan-3-oles y antocianos; los flavonoles son responsables del color amarillo de los hollejos de las uvas blancas y por consiguiente del color del vino blanco y en menor medida del color del vino tinto; pero los flavonoides más importantes son los antocianos, pigmentos responsables del color en los vinos tintos y que se localizan exclusivamente en el hollejo, aunque ocasionalmente también en la pulpa de las variedades *tintoreras*. [9]

Los compuestos fenólicos no flavonoides concretamente los antocianos (moléculas planas) pueden unirse entre ellos o a otras moléculas formando asociaciones, dando lugar a estructuras tipo sándwich; este proceso se conoce como copigmentación. La copigmentación aumenta las coloraciones del vino e incluso varía su tonalidad. Ejemplos de asociaciones de los antocianos con otras moléculas dando lugar a nuevas coloraciones (pigmentos) se dan si se unen antocianos con flavan-3-oles (se origina un nuevo pigmento, más estable, que mantiene el color rojo) y si los antocianos reaccionan con el ácido pirúvico generan la (vitisina A), que da coloraciones anaranjadas etc. [9]

Para la extracción de colorantes alimentarios en vinos, se pueden emplear diversos métodos, entre ellos, los siguientes:

- Método de Diazotación de la Anilina: consiste en la reducción del doble enlace azo para provocar la hidrólisis del mismo, formando una amina, la cual reacciona con el ácido nítrico, formando sales de arildiazonio (que indican la presencia de colorantes).
- Método de Arata-Possetto: se basa en el comportamiento de los colorantes sometido a un medio ácido, cuando se les añade lana para fijarlos en ella. Pueden identificarse por espectrofotometría, añadiendo a la muestra acetato de amonio, realizando la medida de los espectros empleando como blanco el propio acetato de amonio. [10]

En este trabajo el método escogido ha sido el de Arata-Posseto, ya que es un método muy sencillo, en el que se emplean equipos de fácil manejo, que pueden encontrarse en cualquier laboratorio, como un espectrofotómetro para la determinación final. Una técnica analítica frecuente en este tipo de análisis es la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), pero el acceso a un cromatógrafo de líquidos es más difícil y los análisis son más caros. Por ello, aquí se plantea el desarrollo de un procedimiento de análisis sencillo, para determinar tres colorantes alimentarios azoicos (E-123, E-124 y E-129) cuyo uso es habitual en la industria alimentaria, pero que no está permitido adicionar al vino.

## 2. OBJECTIVES

To study the spectral signals, in different media, of the colorants of interest.

To optimize the extraction, based on the Arata-Posseto's method, of E-123, E-124 and E-129 from wine samples.

To perform the qualitative determination of the food colorants in wine through thin-layer chromatography.

To approach the spectrophotometric determination of the food colorants in wine by means of the partial least squares regression.

## 3. TEORÍA

### 3.1. Diseño de experimentos central compuesto

Los diseños de superficie de respuesta, entre los que se encuentran los diseños centrales compuestos, se utilizan para buscar, de la forma más eficiente, los valores de las variables experimentales (factores) que llevan a la mejor respuesta. [11]

Una vez definido el dominio experimental, se propone un modelo matemático para relacionar la respuesta a optimizar con los factores experimentales. Este modelo puede ser lineal, cuadrático (para tener en cuenta posibles curvaturas), etc., y puede incluir términos cruzados para evaluar la existencia de interacciones entre factores. Establecido el modelo a ajustar, se plantea la matriz del experimento más adecuada y, a partir de ella, el plan experimental a seguir para estimar los coeficientes del modelo. A modo de ejemplo, en la figura 1 se pueden ver los puntos experimentales correspondientes a un diseño central compuesto centrado en las caras para 2 factores.

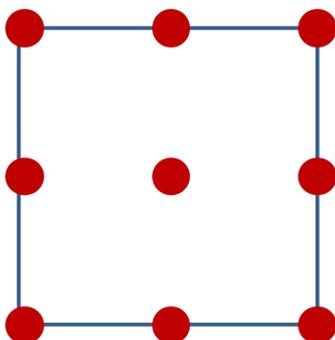


Fig. 1 Diseño central compuesto para 2 factores centrado en las caras.

Una vez ajustada la superficie de respuesta y validado el modelo, es posible evaluar la respuesta en cualquier punto del dominio experimental y encontrar las condiciones óptimas.

### 3.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales

Cuando se tienen señales multivariantes no específicas, como ocurre en los espectros de absorción molecular, y las bandas de los distintos compuestos se solapan, no es posible llevar a cabo la determinación cuantitativa desde una aproximación univariante. Además, en este caso, las absorbancias registradas a longitudes de onda próximas se encuentran altamente correlacionadas, por lo que tampoco es posible abordar el problema mediante una regresión lineal múltiple por mínimos cuadrados. Una alternativa viable es utilizar una técnica de regresión blanda, como la regresión por mínimos cuadrados parciales (partial least squares regression, PLS). [12]

La regresión PLS se basa en buscar las direcciones de máxima varianza de los datos experimentales (considerando, como variables predictoras, el espectro completo de cada muestra) pero evitando las direcciones no correlacionadas con la respuesta (la concentración del analito de interés). Para ello, construye combinaciones lineales de las variables predictoras; que se denominan variables latentes y se construyen de modo que no estén correlacionadas entre sí. Los coeficientes de las combinaciones lineales se conocen como pesos, y las coordenadas de cada muestra en el nuevo espacio vectorial definido por las variables latentes, como puntuaciones.

Generalmente, cuantas más variables latentes formen el modelo, mayor será la varianza explicada por este y menor el error cuadrático medio en calibración (Root Mean Squares Error of Calibration, RMSEC). Sin embargo, si se consideran demasiadas variables latentes, se corre el riesgo de que el modelo esté sobreajustado, es decir, que no sea capaz de predecir correctamente la respuesta en muestras ajenas al mismo. Así, para decidir cuántas variables latentes deben formar parte del modelo, se considera el error cuadrático medio en predicción (Root Mean Squares Error of Cross-Validation, RMSECV); el mejor modelo será aquel que, con el menor número de variables latentes, conduzca al valor de RMSECV menor.

Una forma de evaluar el RMSECV es utilizar una técnica de validación cruzada (cross-validation), que consiste en dejar algunas muestras fuera del conjunto de calibración, construir el modelo PLS con las restantes, predecir la concentración de las primeras, y repetir el proceso hasta que se ha predicho la respuesta de todas las muestras. En el método de validación cruzada de persianas venecianas, se seleccionan en bloque las muestras en las que se predice la respuesta, con una determinada alternancia. El RMSECV se estima a partir de las respuestas predichas para esas muestras.

Por otro lado, es habitual evaluar la presencia de datos anómalos mediante dos índices, los estadísticos  $Q$  y  $T^2$  de Hotelling. El índice  $Q$  hace referencia a la suma de cuadrados residual y es el residuo ortogonal de cada muestra al espacio multidimensional definido por el modelo, mientras que el estadístico  $T^2$  de Hotelling es la distancia de cada muestra al centroide. Se considera que una muestra es anómala si los dos índices están por encima del valor crítico establecido con un nivel de significación determinado.

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1. Disoluciones y reactivos

Se han empleado los colorantes Amaranto (E-123), con una pureza entre 85-95%, de Sigma; Rojo Allura AC (E-129), con una pureza del 80%, y Ponceau 4R (E-124) de Sigma-Aldrich; y eritrosina (E-127), con una pureza >80%, de Merck. También se ha utilizado hidróxido de amonio (25%) de Sigma-Aldrich y ácido clorhídrico (37% p/v) de Prolabo. Otros disolventes empleados han sido n-butanol (99.5%) de Panreac, etanol (96% v/v) de Panreac.

Se han preparado disoluciones madre de 10 y 25 mg L<sup>-1</sup> de cada colorante. A partir de estas, se preparan las disoluciones patrón y las muestras de vino enriquecidas (con 10 mg L<sup>-1</sup> de cada colorante).

Como muestras problema se tienen tres vinos comerciales; un vino tinto, un vino rosado y un vino blanco. Asimismo, se preparan muestras enriquecidas con E-123, E-124 y E-129, así como una muestra adicional que se enriquece con E-127. Todas las muestras se preparan por triplicado.

La fase móvil de la cromatografía en capa fina se prepara con 50 mL de n-butanol, 25 mL de etanol, 10 mL de hidróxido amónico y 25 mL de agua destilada.

### 4.2. Materiales e instrumentación

Para la extracción se ha empleado lana de oveja limpia y lavada con lejía. La cromatografía en capa fina se ha realizado utilizando placas de aluminio con una película de celulosa F (Merck), de 20 x 20 cm, y una cámara de desarrollo de doble compartimento.

Antes de registrar los espectros, las muestras se filtran con filtros de jeringa de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófilo de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro, de LABBOX.

Las medidas espectrofotométricas se han realizado con un espectrofotómetro UV-visible Cary 50 Conc de Varian, obteniendo los valores de absorbancia con intervalos de 5 nm, entre las longitudes de onda de 380 y 800 nm.

### 4.3. Procedimiento experimental.

De forma general, el procedimiento experimental empleado para la extracción de los colorantes en las distintas muestras de vino ha sido el que se describe a continuación. A un volumen de 20 mL de vino se añaden 0,3 mL de ácido clorhídrico, y se pone a calentar. Cuando el líquido empieza a hervir, se añade una cantidad determinada de lana y se mantiene a ebullición durante 5 min. A continuación, se extrae la lana del vaso y se lava con agua para eliminar los restos de ácido clorhídrico y los colorantes naturales del vino que hayan podido quedar retenidos en la lana. Una vez lavada esta, se extraen los colorantes azoicos retenidos en ella, para ello se introduce en un vaso de precipitados y se añaden un volumen de agua y un volumen de hidróxido amónico. El vaso se coloca sobre una placa calefactora y se calienta hasta que el líquido hierve, manteniéndose en ebullición durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, se extrae la lana. Las condiciones de los factores experimentales que no se han especificado, se estudian y optimizan a lo largo de la memoria.

En el caso de las muestras problema de vino, enriquecidas y sin enriquecer, tras obtenerse el extracto final, este se lleva a un matraz de 20 mL y el volumen hasta el enrase se completa con agua destilada.

En los análisis mediante cromatografía en capa fina, se deposita una gota de la disolución a analizar sobre la placa de celulosa y se deja secar; esto se repite dos veces más. Se vierte un volumen de fase móvil en la cámara cromatográfica sin que se alcancen los puntos de los pinchazos, y se introduce la placa, se tapa la cámara y se espera hasta que las manchas se encuentren claramente separadas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Ensayos previos

En primer lugar, se estudian los espectros de absorción molecular en el UV-visible, en distintos medios, de los colorantes alimentarios que se quieren determinar; en medio acuoso, en vino y en medio amoniacal. La figura 2 muestra los espectros del E-123, el E-124 y el E-129 en agua y en vino blanco. Se puede ver claramente cómo las bandas de absorción de los tres colorantes se encuentran completamente solapadas. Por otro lado, no se aprecian desplazamientos significativos de las bandas de un medio a otro.

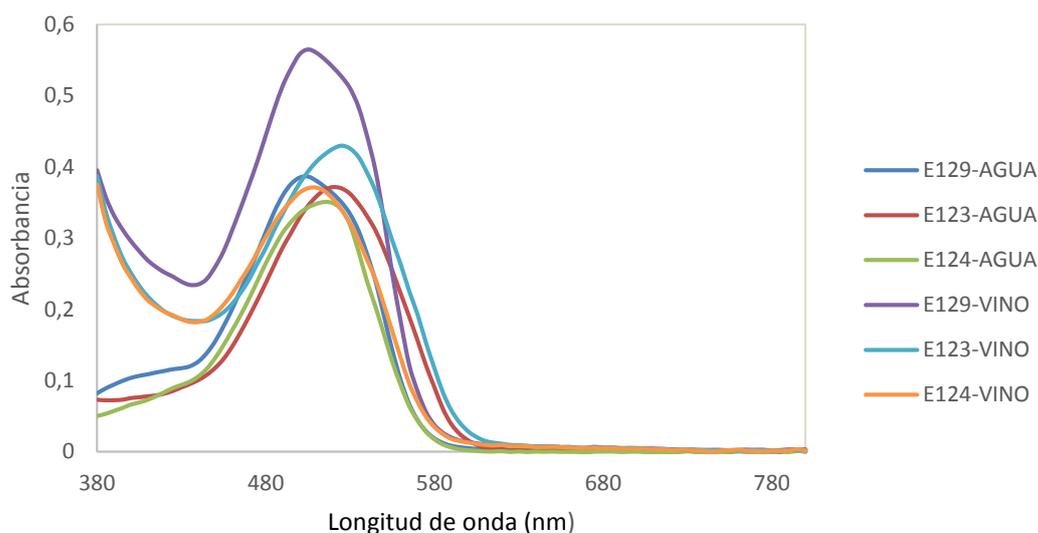


Fig. 2 Espectros de los distintos colorantes ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), en agua y en vino blanco.

Lo mismo ocurre cuando se consideran los espectros registrados en medio amoniacal y en agua (figura 3), las bandas se encuentran fuertemente solapadas en ambos medios y no se observan desplazamientos o cambios de intensidad de los máximos de absorción significativos. Esto es relevante ya que, para realizar un análisis cuantitativo, es posible preparar las muestras de calibrado en medio acuoso y determinar, con el modelo que se ajuste, la concentración de los colorantes en las muestras de vino que, tras el proceso de extracción, estarán en medio amoniacal.

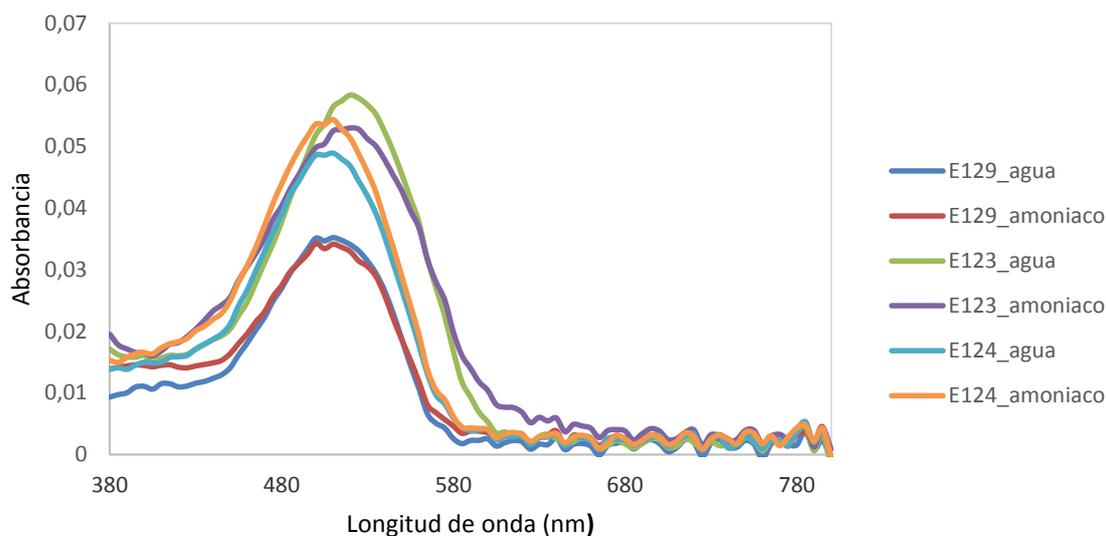


Fig. 3 Espectros de los distintos colorantes ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), en agua y en amoníaco.

## 5.2 Optimización de la extracción de colorantes azoicos en vinos

### 5.2.1 Estudio del efecto de la cantidad de lana utilizada

En primer lugar, se estudia si utilizar más o menos cantidad de lana va a influir de forma significativa en la extracción de los colorantes azoicos. Para ello, se lleva a cabo la extracción de estos colorantes en muestras de un vino blanco que se han enriquecido, de manera independiente, para tener  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de los tres colorantes alimentarios. Se realiza la extracción con la lana en medio clorhídrico, se retira la lana, y se analiza líquido remanente.

El método OIV-MA-AS315-08 establece que, partiendo de 200 mL de vino, se utilicen 0.5 g de lana para realizar la extracción. En el procedimiento experimental desarrollado en este trabajo, se parte de un volumen de vino de 20 mL, por lo que la cantidad de lana en torno a cuál se realiza el estudio se ha reducido de manera proporcional. Se consideran tres niveles de cantidad de lana distintos: 0,08, 0,06 y 0,04 g. Cada muestra de vino, enriquecida con uno de los colorantes, es analizada por triplicado. Las extracciones se realizan empleando 20 mL de muestra y 50 mL de agua. [13]

Una vez realizada la extracción se registran los espectros del líquido remanente y se considera la absorbancia en el máximo de absorción de cada colorante. Los valores que se obtienen se muestran en la tabla 1. Con ellos se lleva a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor a tres niveles, que se muestra en la tabla 2.

Es necesario validar el modelo subyacente al ANOVA para lo que se debe comprobar el cumplimiento de las hipótesis previas sobre los residuos: que estos siguen una distribución normal y que las varianzas entre los distintos niveles son homogéneas.

Tabla 1 Máximos de absorbancia tras la extracción, con distintas cantidades de lana, de los tres colorantes.

Lana (g)	Réplica	Absorbancia		
		E-123 ( $\lambda = 525 \text{ nm}$ )	E-124 ( $\lambda = 515 \text{ nm}$ )	E-129 ( $\lambda = 505 \text{ nm}$ )
0,08	1	0,0259	0,0351	0,1097
	2	0,0330	0,0261	0,1339
	3	0,0424	0,0297	0,1313
0,06	1	0,0729	0,0378	0,1593
	2	0,0556	0,0360	0,1344
	3	0,0943	0,0310	0,1525
0,04	1	0,1015	0,0714	0,2495
	2	0,0748	0,0619	0,2313
	3	0,0963	0,0524	0,1761

Tabla 2 Análisis de la varianza para la extracción, con distintas cantidades de lana, de los tres colorantes.

Colorante	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor P
E-123	Entre grupos	0,0051	2	0,0025	12,04	0,0079
	Intra grupos	0,0012	6	0,0002		
	Total	0,0064	8			
E-124	Entre grupos	0,0017	2	0,00087	21,25	0,0019
	Intra grupos	0,0002	6	0,00004		
	Total	0,0019	8			
E-127	Entre grupos	0,0143	2	0,0071	11,94	0,0081
	Intra grupos	0,0036	6	0,0006		
	Total	0,0179	8			

Para verificar la homogeneidad de varianzas, se utilizan los test de Cochran y Bartlett. La hipótesis nula ( $H_0$ ) para ambos test es que las varianzas homogéneas. La hipótesis alternativa ( $H_a$ ) para el test de Cochran es que al menos una de las varianzas es distinta, mientras que, para el test de Bartlett, es que existen grupos de varianzas. Se tienen los siguientes valores de probabilidad (valor P) para los tests de Cochran y Bartlett, respectivamente: 0,5201 y 0,5853 (para el E-123); 0,2182 y 0,4118 (para el E-124) y por último 0,1081 y 0,2645 (para el E-129). En todos los casos, los valores de

probabilidad son mayores de 0.05, por lo que no se tienen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula y, por tanto, esta se tiene que aceptar. Se concluye, en consecuencia, con un nivel de confianza del 95%, que las varianzas son iguales.

Asimismo, para verificar la normalidad de la distribución de los residuos se realizan diversos test de hipótesis (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, Chi-cuadrado,...). En todos ellos, la hipótesis nula es que los residuos son normales, y la alternativa es que no lo son. Se han obtenido, en todos los casos, valores de probabilidad mayores de 0.05 por lo que, con un nivel de confianza del 95%, se debe concluir que los residuos son normales. Los tres ANOVAS cumplen las hipótesis previas y, por tanto, son válidos.

Para evaluar el efecto del factor, en un ANOVA la hipótesis nula ( $H_0$ ) es que no existe efecto del factor, y la alternativa ( $H_a$ ) que sí que existe. Como se puede observar en la tabla 2, el nivel de significación obtenido es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se concluye, con un 95% de confianza, que existe efecto del factor, es decir, que sí influye, en la cantidad de cada colorante extraída, la cantidad de lana que se utilice en la extracción.

### 5.2.2. Optimización de la cantidad de lana y del volumen de amoníaco

A continuación, se plantea llevar a cabo la optimización conjunta de la cantidad de lana y del volumen de amoníaco, ya que podrían existir interacciones entre estos dos factores experimentales que no se tendrían en cuenta si la optimización se realiza por separado para cada factor. Para ello, se utiliza el diseño de experimentos central compuesto (centrado en las caras) que se muestra en la figura 1, con el que se quiere ajustar el siguiente modelo de superficie de respuesta:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} X_1 X_2$$

Como se puede ver, se trata de un modelo cuadrático, en el que el último término se corresponde con la interacción. Los dos factores experimentales son el volumen de amoníaco ( $x_1$ , Vol.  $NH_3$ ) y la cantidad de lana ( $x_2$ , Lana).

Para explorar el volumen de amoníaco para la reextracción de los colorantes fijados en la lana que debe cubrir el dominio experimental, se realizan unos experimentos previos, para el E-129, con distintos volúmenes. Se llevó a cabo la extracción de disoluciones acuosas que contenían  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de E-129. Se utilizaron 0.08 g de lana en la extracción inicial, y la reextracción del colorante fijado en la lana se realizó con 50 mL de agua y con 40  $\mu\text{l}$ , 80 $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 120  $\mu\text{l}$  y 160  $\mu\text{l}$  de amoníaco.

En la figura 4 se pueden ver las fibras de lana y la disolución resultante tras la reextracción con los distintos volúmenes de amoníaco que se indican. Se puede apreciar cómo, cuanto mayor es el volumen de amoníaco empleado, mayor coloración tiene la disolución, es decir, se reextrae mayor cantidad de colorante. Se decidió ampliar un poco más el intervalo y llegar hasta los 180  $\mu\text{l}$  de amoníaco en el diseño.



Fig. 4 Fibras de lana y disolución resultante tras la reextracción del E-129 con distintos volúmenes de amoníaco, que aparecen indicados en cada vaso de precipitados.

En la Tabla 3 se muestra la matriz del diseño y el plan experimental correspondientes al diseño experimental planteado. El diseño consta de 11 experimentos; los 2 últimos experimentos de la tabla son réplicas del punto central (exp. 9).

Para llevar a cabo la experimentación, que se realiza por triplicado y de forma independiente para cada colorante, se extrae el colorante de una disolución de agua con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada colorante, siguiendo el procedimiento experimental que se ha indicado, pero con la cantidad de lana y el volumen de amoníaco concentrado que corresponde según el diseño. Por último, se registra el espectro de absorción molecular del extracto. Como respuesta del diseño se considera la absorbancia registrada a 520 nm para el E-123, a 525 nm para el E-124 y a 525 nm para el E-129. Los valores obtenidos en los distintos experimentos aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3 Matriz del diseño, plan experimental y respuestas del diseño central compuesto.

Exp.	Matriz del diseño		Plan experimental		Respuestas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Vol. NH <sub>3</sub> (µL)	Lana (g)	Absorbancia E-129	Absorbancia E-123	Absorbancia E-124
1	-1	-1	40	0.04	0.096	0.106	0.037
2	1	-1	180	0.04	0.111	0.058	0.123
3	-1	1	40	0.08	0.157	0.066	0.076
4	1	1	180	0.08	0.187	0.145	0.114
5	-1	0	40	0.06	0.12	0.066	0.054
6	1	0	180	0.06	0.154	0.105	0.099
7	0	-1	110	0.04	0.124	0.062	0.099
8	0	1	110	0.08	0.195	0.098	0.108
9	0	0	110	0.06	0.123	0.066	0.094
10	0	0	110	0.06	0.198	0.07	0.081
11	0	0	110	0.06	0.208	0.063	0.071

Con las respuestas obtenidas, se ajusta, por mínimos cuadrados, un modelo de superficie de respuesta, que posteriormente se valida, para cada colorante. En la validación de cada modelo, se comprueba, a través de los correspondientes test de hipótesis, que el modelo es significativo (hipótesis nula, H<sub>0</sub>: la regresión no es significativa; hipótesis alternativa, H<sub>a</sub>: sí que lo es) y que no tiene fallo de ajuste (H<sub>0</sub>: el sesgo es cero; H<sub>a</sub>: el sesgo es positivo). Si la significación de un test es mayor de 5, se

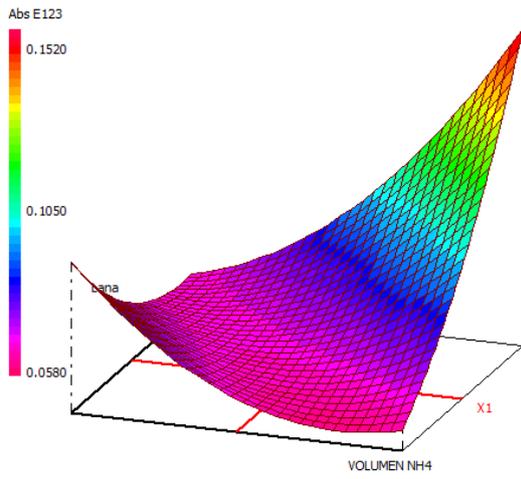
rechaza  $H_0$  a un nivel de significación  $\alpha=0.05$ . Asimismo, se estudian los residuos, de modo que se verifica que siguen una distribución normal ( $H_0$ : los residuos siguen una distribución normal;  $H_a$ : no la siguen) y que ninguno de ellos es anormalmente grande (mayor de 2.5 en valor absoluto), lo que denotaría la presencia de algún dato anómalo.

Al validar dichos modelos, se ve que el modelo estimado para el E-129 no es estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95% (significación = 17,2; mayor de 5, por lo que no se puede rechazar  $H_0$ ). Al estudiar los residuos de dicho modelo, se observa que un dato, el experimento 9, presenta un residuo estudentizado cuyo valor, en valor absoluto, es mayor de 2,5, por lo que se considera anómalo y se elimina del conjunto de datos. Se ajusta un nuevo modelo con el resto de datos, obteniéndose un modelo que sí que es significativo (significación < 5) y que no tiene fallo de ajuste (significación > 5), a un nivel de confianza del 95%, al igual que los modelos estimados para los otros dos colorantes (Tabla 4). Asimismo, en todos los casos se ha comprobado que no hay datos anómalos y que los residuos siguen una distribución normal. Los coeficientes de determinación de estos modelos son bastante altos; 0.963, 0.935 y 0.918 para el E-123, E-124 y E-129, respectivamente.

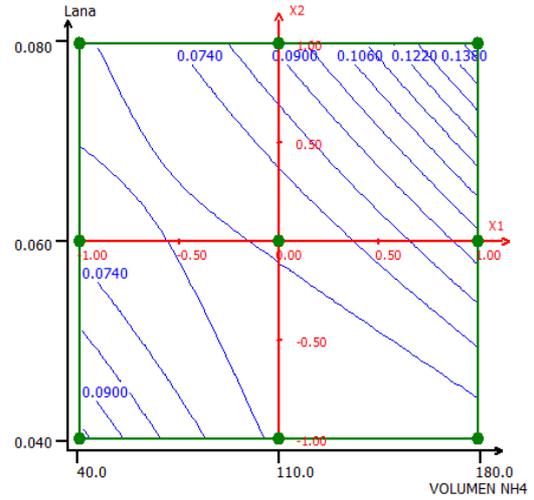
Tabla 4 Análisis de la varianza (ANOVA) de los modelos ajustados.

Colorante	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón	Significación (%)
E-123	Regresión	0.0073	5	0.0015	25.92	0.14
	Residuos	0.0003	5	0.0001		
	Fallo de ajuste	0.0003	3	0.0001	6.41	13.80
	Error	0.0000	2	0.0000		
	Total	0.0076	10			
E-124	Regresión	0.0064	5	0.0013	14.38	0.55
	Residuos	0.0004	5	0.0001		
	Fallo de ajuste	0.0002	3	0.0001	0.45	74.50
	Error	0.0003	2	0.0001		
	Total	0.0068	10			
E-129	Regresión	0.0137	5	0.0027	9.00	2.68
	Residuos	0.0012	4	0.0003		
	Fallo de ajuste	0.0012	3	0.0004	7.73	25.70
	Error	0.0001	1	0.0001		
	Total	0.0149	9			

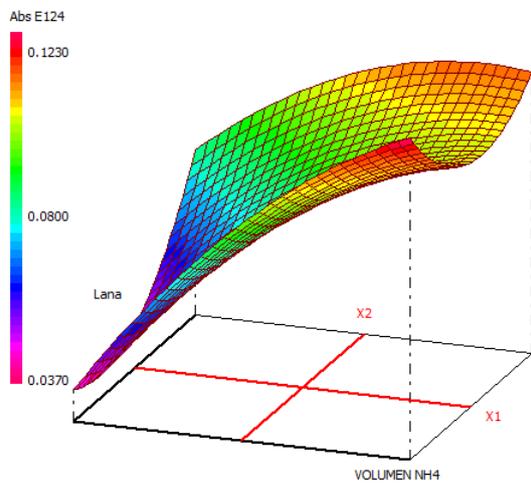
En la Fig. 5 se pueden ver representaciones gráficas de la superficie ajustada para cada colorante. Las condiciones de extracción óptimas para el E-123 se encuentran con una cantidad de lana de 0.08 g y 180  $\mu$ L de amoníaco (fig. 5a-b). Sin embargo, para el E-124 hay dos zonas que llevan a valores de respuesta altos (fig. 5c-d), cuando la extracción se realiza con 180  $\mu$ L de amoníaco y 0.04 g o 0.08 g de lana. En el caso del E-129 (fig. 5e-f) la extracción óptima se produce cuando se utilizan 0.08 g de lana y en torno a 120  $\mu$ L de amoníaco.



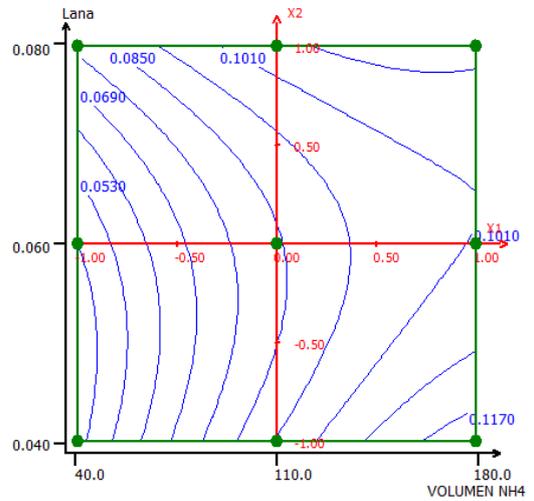
(a)



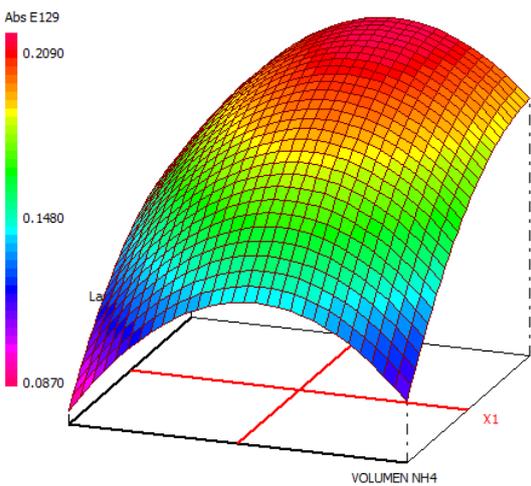
(b)



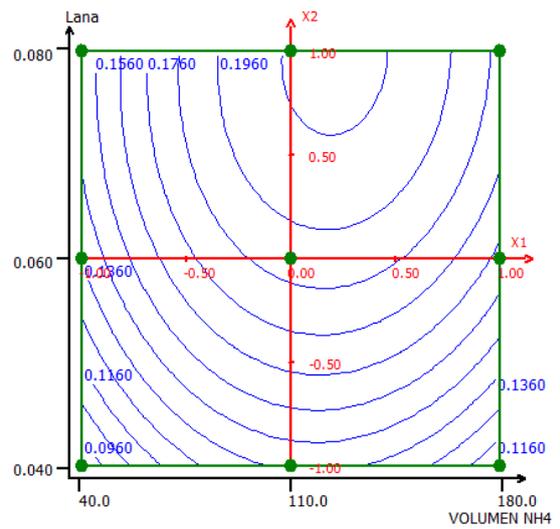
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 5 Superficie de respuesta y curvas de nivel de los modelos ajustados para (a-b) E-123, (c-d) E-124 y (e-f) E-129.

Como el análisis de los tres colorantes en una muestra problema se llevaría a cabo de forma conjunta, es necesario encontrar unas condiciones de extracción únicas para ello. Se seleccionan, como condiciones óptimas de extracción, 0.08 g de lana y 178  $\mu$ L de amoníaco, que son los valores que se consideran para estos dos parámetros en adelante.

### 5.2.3. Optimización del volumen de agua para la reextracción

Por último, se estudia la influencia del volumen de agua, que se emplea en la reextracción del colorante fijado en la lana. Para ello, se realizan extracciones, en las condiciones óptimas encontradas en el apartado anterior, con distintos volúmenes de agua: 20, 35 y 50 mL. Como el volumen total de disolución varía en cada caso, para la reextracción de los colorantes se utiliza un volumen proporcional de amoníaco. El proceso de extracción completo se realiza, en cada caso, por triplicado (figura 6).

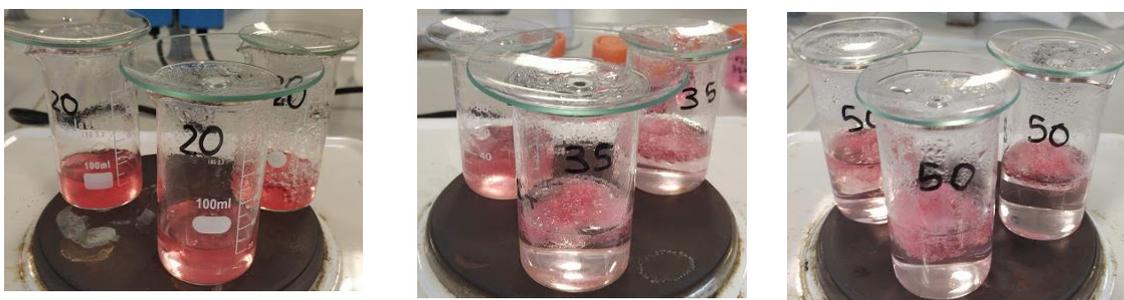


Fig. 6 Estudio de la reextracción con distintos volúmenes de agua (20, 35, y 50 mL).

Tras la reextracción, se retira la lana, se registran los espectros de la disolución y se anotan los valores de absorbancia en el máximo de absorción de cada colorante. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5. Con estos valores se realiza un ANOVA de un factor a tres niveles (20, 35 y 50 mL).

Tabla 5 Máximos de absorbancia tras la reextracción, con distintos volúmenes de agua, de los tres colorantes

Agua (mL)	Réplica	Absorbancia		
		E-123 ( $\lambda = 520 \text{ nm}$ )	E-124 ( $\lambda = 510 \text{ nm}$ )	E-129 ( $\lambda = 505 \text{ nm}$ )
20	1	0,1358	0,0778	0,2275
	2	0,1632	0,1082	0,3679
	3	0,1405	0,0715	0,2680
35	1	0,1838	0,0828	0,2939
	2	0,1234	0,0793	0,3270
	3	0,1407	0,0871	0,3727
50	1	0,1040	0,1334	0,3703
	2	0,0976	0,0904	0,3169
	3	0,1003	0,0853	0,2614

Como en el caso anterior, en primer lugar, se comprueba que se verifican las hipótesis previas. Los datos obtenidos del valor de probabilidad para los test de Cochran y Bartlett, con un 95% de confianza, son: para el test de Cochran 0,1072 (E-123); 0,3996 (E-124) y 0,6478 (E-129); y para el test de Bartlett 0,0623 (E-123); 0,1318 (E-124) y 0,7522 (E-129). Por lo que se concluye que las varianzas son homogéneas. Además, también se ha comprobado, a través de los tests de hipótesis correspondientes, los mismos utilizados anteriormente, que los residuos siguen una distribución normal, con un 95% de confianza.

La tabla 6 muestra los resultados de los ANOVAS realizados. Se puede ver cómo, para el E-124 y el E-129, con un nivel de significación del 5%, se concluiría que no existe efecto del factor, mientras que para el E-123, se llegaría a esta misma conclusión con una significación del 6%. Por tanto, se considera que no existe efecto significativo en la reextracción de los colorantes por el hecho de variar el volumen de agua utilizado. Se decide utilizar a partir de este punto un volumen de agua de 20 mL (que implica un volumen de amoníaco de 71.2  $\mu$ L).

Tabla 6 Análisis de la varianza para la extracción, con distintas cantidades de lana, de los tres colorantes.

Colorante	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
E-123	Entre grupos	0,0044	2	0,0022	5,62	0,0421
	Intra grupos	0,0023	6	0,00039		
	Total	0,0068	8			
E-124	Entre grupos	0,0007	2	0,00035	0,96	0,4346
	Intra grupos	0,0021	6	0,00036		
	Total	0,0029	8			
E-129	Entre grupos	0,0029	2	0,0014	0,45	0,6585
	Intra grupos	0,0195	6	0,0032		
	Total	0,0224	8			

### 5.3 Determinación de colorantes en muestras de vino

#### 5.3.1 Determinación cualitativa mediante cromatografía en capa fina

Para llevar a cabo un estudio cualitativo de los colorantes que se pudieran haber añadido a un vino, tras la extracción de estos con el procedimiento optimizado en el

apartado anterior, se plantea el uso de la cromatografía en capa fina (thin-layer chromatography, TLC) para su separación y detección.

Se ha realizado el análisis cromatográfico de una muestra de vino tinto y de otra de vino blanco, sin enriquecer y enriquecidas con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de los tres colorantes, que se han sometido al procedimiento de extracción. Asimismo, se han analizado los extractos finales y algunas de las disoluciones y extractos intermedios. En la tabla 7 se recogen imágenes de todas las muestras que se han analizado por TLC.

Tabla 7 Muestras y extractos analizados mediante TLC tanto para para el vino tinto como para el vino blanco.

Muestra	Vino tinto		Vino blanco	
	Vino	Vino enriquecido	Vino	Vino enriquecido
Vino	1 	2 	1 	2 
Vino tras la extracción con lana en medio clorhídrico	3 	4 	3 	4 
Agua de lavado de la lana	5 	6 	5 	6 
Extracto tras la reextracción en medio amoniacal	7 	8 	7 	8 

En la figura 7 aparecen las placas cromatográficas correspondientes a los análisis de las muestras de la tabla 7, realizados siguiendo el procedimiento cromatográfico descrito en el apartado 4.3. Los pinchazos pares se corresponden con muestras y extractos de vino enriquecido, y los impares, sin enriquecer. En el pinchazo 1 de la placa obtenida para el vino tinto se puede ver cómo hay algunos colorantes naturales presentes en el vino que, por su naturaleza química, no han eluido, pero otros que han avanzado un poco y se han separado ligeramente del lugar del pinchazo. En el caso

del vino blanco, estos últimos apenas se perciben. Sin embargo, en los pinchazos de muestras de vino enriquecidas (etiquetadas con un 2), se observa con claridad cómo los colorantes alimentarios añadidos eluyen hasta alcanzar posiciones que permiten diferenciarlos entre sí (el que más avanza es el E-129, luego el E-124 y, por último, el E-123), y de los colorantes naturales del vino.

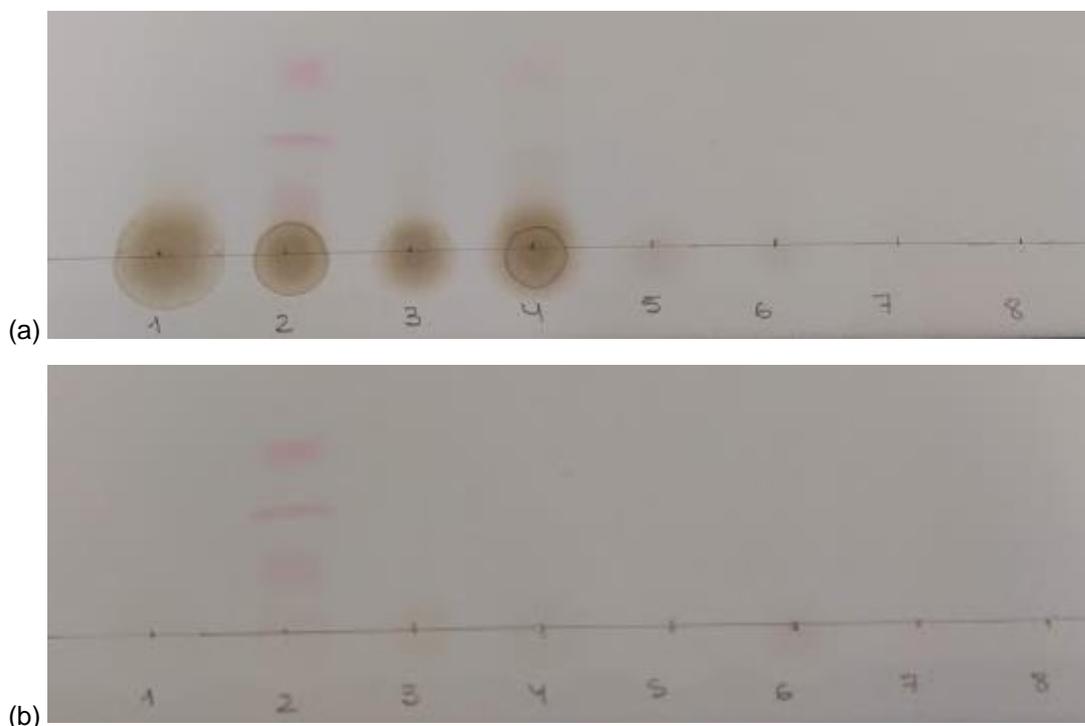


Fig. 7 Placas cromatográficas obtenidas en el análisis del vino (a) tinto y (b) blanco. La codificación de los pinchazos se corresponde con la de las muestras de la tabla 7.

En los pinchazos 3 y 4 se puede ver cómo en el vino tinto, tras la extracción con la lana, siguen estando los colorantes naturales del mismo (3), que no se fijan sobre ésta y, en el caso del vino enriquecido, los colorantes artificiales se han quedado en la lana y no se ven en el pinchazo correspondiente (4). Lo mismo ocurre en el caso del vino blanco.

En las aguas de lavado (pinchazos 5 y 6) se aprecian manchas correspondientes a colorantes naturales que se han retirado del vino con la lana, pero que no se encuentran unidos a esta. Y, por último, los extractos finales de los vinos enriquecidos (8), ponen de manifiesto la eficacia del proceso de extracción utilizado ya que no se aprecian las manchas de los colorantes alimentarios añadidos ni en el vino tinto ni en el blanco.

En principio, la cromatografía en capa fina se utiliza con fines cualitativos, pero también se puede utilizar para cuantificar la concentración de diversos compuestos en vino. [14]

### 5.3.2. Determinación cuantitativa mediante espectrofotometría UV-Vis.

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de los colorantes en las muestras de vino, en este trabajo se emplea la espectrofotometría de absorción

molecular en el UV-Vis. Dado que los tres colorantes en estudio presentan espectros en el visible cuyas bandas de absorción se solapan (figura 2), es necesario utilizar un método de análisis multivariante. En este trabajo, se utiliza la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En una primera etapa, la etapa de calibración, se registran las absorbancias entre 380 y 600 nm (221 en total) de las mezclas de colorantes que se recogen en la Tabla 8. Estas medidas, dispuestas en una matriz de dimensión  $15 \times 221$ , constituyen el conjunto de calibrado o aprendizaje, mientras que la respuesta son las concentraciones de los tres colorantes en dichas mezclas, de dimensión  $15 \times 3$ .

Tabla 8 Concentraciones de los colorantes en las mezclas del conjunto de calibrado.

Experimento	Concentración E-123 (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración E-124 (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración E-129 (mg L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1
2	3	1	1
3	1	3	1
4	3	3	1
5	1	1	3
6	3	1	3
7	1	3	3
8	3	3	3
9	0	2	2
10	4	2	2
11	2	0	2
12	2	4	2
13	2	2	0
14	2	2	4
15	2	2	2

Se ajusta un modelo de regresión PLS conjunto para la determinación simultánea de los tres colorantes, utilizando los datos brutos, sin ningún tipo de tratamiento previo. Para la validación cruzada se emplea la técnica de ventanas venecianas, dividiendo el conjunto de aprendizaje en 3 subconjuntos de validación (seleccionado una muestra de cada tres). Durante la construcción de dicho modelo, se observa que el error cuadrático medio en predicción (RMSECV) para el E-124 y el E-129 no disminuyen al incrementar el número de variables latentes, como sí lo hace el error cuadrático medio en calibración (RMSEC). En muchas ocasiones esto se debe a la presencia de algún dato anómalo. Aunque ningún dato presenta valores de Q y T<sup>2</sup> de Hotelling por encima de los valores umbral, al 95% de confianza, ni residuos estudentizados (en valor absoluto) mayores de 2.5, al representar gráficamente la concentración calculada para los tres colorantes en predicción (validación cruzada) frente a la concentración real, se detectan dos datos anómalos, los datos 14 y 15 de la Tabla 8, que se eliminan del conjunto de calibrado.

Las características de los modelos de regresión obtenidos con los datos restantes se muestran en la Tabla 9. De ellos, se ha seleccionado el modelo con cinco variables latentes, ya que es el que lleva a valores más bajos de RMSECV para los tres

colorantes al tiempo. Se alcanzan coeficientes de determinación de 0.994, 0.951 y 0.970, y coeficientes de determinación en predicción de 0.976, 0.892 y 0.912, en la determinación de E-123, E-124 y E-129, respectivamente.

Tabla 9 Porcentajes de varianza explicada y errores cuadráticos medios en predicción de los modelos de regresión PLS construidos con distinto número de variables latentes.

Variable latente	Var. explicada bloque X (%)	Var. explicada bloque Y (%)	RMSECV E-123	RMSECV E-124	RMSECV E-129
1	99.772	84.714	0.9375	1.0301	0.8438
2	99.927	92.466	0.1741	1.0501	0.8288
3	99.938	97.350	0.2583	1.2406	1.0412
4	99.995	97.897	0.2693	0.7014	0.6646
5	99.998	99.430	0.1730	0.3678	0.2809
6	99.999	99.671	0.1992	0.4498	0.2996

Para las determinaciones en vino, se han medido, por triplicado, los espectros de muestras de un vino tinto, un vino rosado y un vino blanco, tras ser sometidas al proceso de extracción optimizado previamente, así como los espectros de estos mismos vinos enriquecidos con 10 mg L<sup>-1</sup> de los colorantes en estudio y, por otro lado, enriquecidos con la misma concentración de otro colorante alimentario adicional, la eritrosina (E-127). Estas señales se han introducido como muestras problema en el modelo PLS ajustado. Sin embargo, al calcular los índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling se ha visto que, en todos los casos, se superan los valores umbral estimados, con un nivel de confianza del 95%, para estos dos índices, como puede verse en la figura 8.

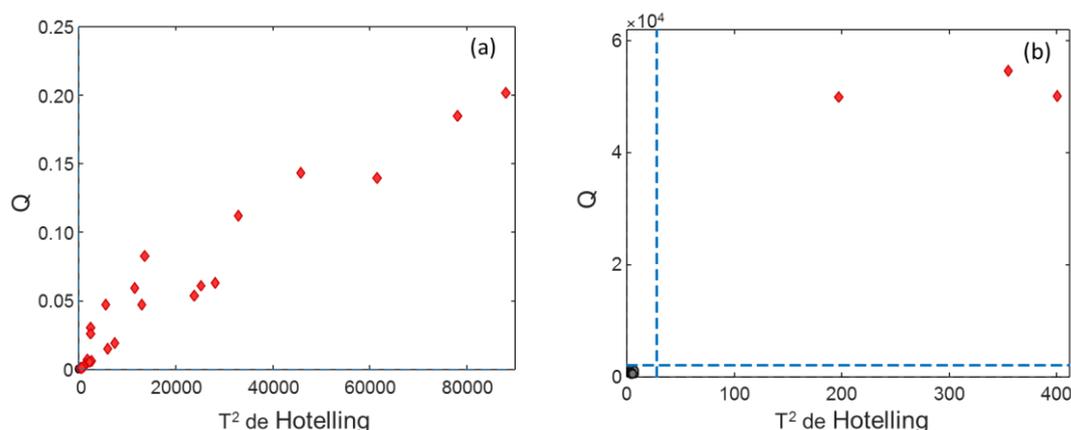


Fig. 8 Índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling de los patrones de calibrado (círculos grises) y las muestras problema (rombos rojos). (a) Gráfico con todas las muestras; (b) ampliación de una zona del gráfico (a). Líneas azules: valores umbral a un nivel de significación del 5%.

Esto implica que las muestras problema no son compatibles con el modelo PLS ajustado y que, por tanto, éste no puede ser utilizado para llevar a cabo las predicciones en las muestras de vino. Esto puede deberse a que hay algún componente de los vinos, que se ha extraído junto con los colorantes alimentarios, y

que presenta una banda de absorción en el UV tan intensa que se solapa con la zona del espectro visible en la que absorben los colorantes en estudio (figura 9).

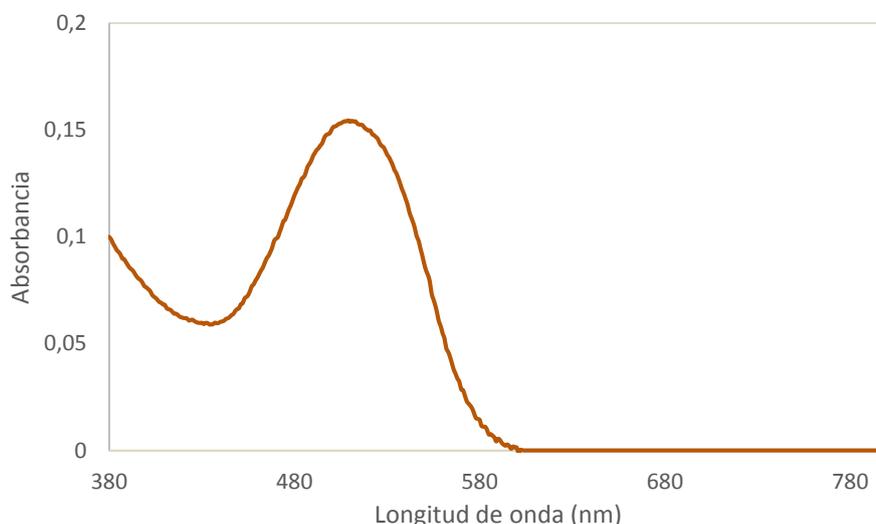


Fig. 9 Espectro de una muestra de vino blanco, enriquecido con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de los colorantes en estudio, tras el proceso de extracción optimizado.

Al no haberse podido calcular las concentraciones de las muestras de vino, no ha sido posible determinar la recuperación del procedimiento de extracción. Tampoco se ha podido evaluar el comportamiento de los modelos ante un colorante alimentario no modelado, el E-127, a través de las estimaciones de las muestras enriquecidas con este colorante.

## 6. CONCLUSIONS

Neither significant shifts nor absorbance changes are noted in the spectra recorded at different media for E-123, E-124 and E-129.

The amount of wool used in the extraction of the food colorants has a significant effect on the extraction efficiency. However, no significant effect is observed for the volume of water used for reextracting the colorants from the wool.

Based on the optimization carried out for some experimental variables, the optimal conditions found for the extraction of the food colorants from wine are: 0.08 g of wool for extraction from wine, and 20 mL of water and 178  $\mu\text{L}$  of ammonium hydroxide for the reextraction from the wool.

The thin-layer chromatography technique makes the qualitative determination of the food colorants in wine possible. This technique has highlighted the efficiency of the extraction procedure developed because no colorants are found in the final extracts.

The PLS models fitted for the determination of the food colorants are not compatible with the test samples because some compounds are extracted from wine, together with the colorants, and interferes in the analysis.

## 7. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Erasmus+ programme of the European Union (Project No. 2018-1-ES01-KA201-049936).

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hong, E., Yoo Lee, S., Yun Jeong, J., Min Park, J., Hee Kim, B., Kwon, K., & Sook Chun, H. (2017). Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category, 1-16.
- [2] San Andrés Moya, M., Sancho, N., y de la Roja de la Roja, J. (2010). Pigmentos y colorantes históricos. *Anales De Química*, 58-65.
- [3] Teodor, C. (1918). *Colorantes artificiales en substancias alimenticias* (Doctor en Ciencias Químicas). Universidad de Buenos Aires.
- [4] Holmberg, L. (2010). *Wine fraud*. Facultad de Derecho de la Universidad de Copenhague.
- [5] Calvo Domper, M. *Colorantes alimentarios* (Trabajo fin de grado). Universidad Complutense, facultad de farmacia.
- [6] Contento Salcedo, A. (1997). *Nuevos métodos fotométricos y cromatográficos para la determinación de colorantes rojos en alimentos* (Doctora en Química analítica). Universidad de Castilla la-Mancha.
- [7] Diario oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la comisión europea de 11 de noviembre de 2011 (2011).
- [8] Geana, E., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O., Stefanescu, I., Ionete, R., y Bala, C. (2015). Verifying the red wines adulteration through isotopic and chromatographic investigations coupled with multivariate statistic interpretation of the data. *ELSEVIER*, 1-9.
- [9] Zamora Marín, F. (2013). La química del color del vino. *ACENOLOGÍA*. Retrieved from [http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/quimica\\_color\\_vino\\_cienc1213.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/quimica_color_vino_cienc1213.htm)
- [10] Nolasco, A., Katheryne, M., & Barrientos, M. (2013). *Identificación cualitativa de colorantes artificiales en raspadillas y cremoladas expandidas en el centro cívico de la ciudad de Trujillo* (Grado académico en Farmacia y Bioquímica). Universidad de Trujillo (Perú).
- [11]. Sarabia, L., & Ortiz, M. (2009). *Comprehensive chemometrics* (1st ed., pp. 345-390). Amsterdam: ELSEVIER: SD Brown, R Tauler y B Walczak
- [12] Geladi, P., & R.Kowalski, B. (1986). Partial least squares regression: a tutorial. *ELSEVIER*, 1-17. Retrieved from <http://home.mit.bme.hu/~horvath/IDA/1-s2.0-0003267086800289-main.pdf>
- [13] Examination of artificial colorants. (2019). *Organización Internacional del Vino y la Viña (OIV)*, (OIV-MA-AS315-08). Volumen II Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/2386/oiv-ma-as315-08.pdf>

[14] Andrés Igea, E. (2017). *Determinación de algunos parámetros físicoquímicos y seguimiento multivariante de la fermentación maloláctica en vinos* (Graduada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos). Universidad de Burgos.