



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

TRABAJO FIN DE GRADO

**DETERMINACIÓN DE LOS COLORANTE E100 Y E133 EN
CEREZAS VERDES DE CÓCTEL.
OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.**



ANA SANTAMARÍA CABALLERO

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Celia Reguera Alonso

Febrero 2019

ÍNDICE

1. ABSTRACT/ RESUMEN	1
2. OBJECTIVES	2
3. INTRODUCCIÓN	2
4. TEORÍA.....	4
4.1. Metodología de superficie de respuesta: diseños Doehlert.....	4
4.2. Diseños de mezclas	5
4.3. Optimización multirrespuesta: función de deseabilidad	6
5. EXPERIMENTAL	7
5.1. Reactivos y muestras.....	7
5.2. Materiales e instrumentación.....	7
5.3. Procedimiento experimental	7
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
6.1. Estudios previos.....	8
6.1. Optimización de la mezcla de extracción	11
6.2. Optimización de las condiciones de extracción	15
6.3. Validación del procedimiento.....	22
6.4. Determinación de los colorantes E100 y E133 en muestras reales.....	23
7. CONCLUSIONES.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24

1. ABSTRACT/ RESUMEN

The determination of E100 and E133 in green cocktail cherries by UV-visible molecular spectrophotometry is carried out in this work. The solid-liquid extraction is optimized using experimental design methodology. In a first step, the optimization of the extracting mixture (composed of ethanol, acetone and acetonitrile) is performed through a mixture design. Next, some extraction conditions are optimized using the response surface methodology, with a Doehlert design; extraction time, volume of extractant and device of extraction (ultrasound bath, magnetic stirrer and vortex stirrer) are considered in the study. A multiresponse optimization technique, the desirability function, is used to optimize the simultaneous extraction of both colorants. The developed analytical method is validated; some figures of merit (trueness, precision, recovery, limit of decision and capability of detection) are studied. E100 and E133 are determined in commercial cocktail green cherries.

En este trabajo se lleva a cabo la determinación de los colorantes E100 y E133 en cerezas de cóctel verdes mediante espectrofotometría de absorción molecular en el UV-Visible. La extracción sólido-líquido de estos colorantes se optimiza utilizando la metodología de diseño de experimentos. Para ello, en una primera etapa, la optimización de la mezcla extractante (compuesta por etanol, acetona y acetonitrilo) se realiza mediante un diseño de mezclas. A continuación, mediante la metodología de superficie de respuesta, con un diseño experimental Doehlert, se optimizan algunas condiciones de extracción: tiempo de extracción, volumen de extractante y dispositivo de agitación (baño de ultrasonidos, agitador magnético y agitador vórtex). Finalmente, mediante una técnica de optimización multirrespuesta, la función de deseabilidad, se optimiza la extracción simultánea de ambos colorantes. El método analítico puesto a punto se valida a través de algunas figuras de mérito (veracidad, precisión, recuperación, límite de decisión y capacidad de detección) y con él se determinan el E100 y el E133 en cerezas de cóctel verdes comerciales.

2. OBJECTIVES

The objectives of this work have been to:

- Optimize the proportion of ethanol, acetone and acetonitrile to extract E100 and E133 from cocktail green cherries.
- Obtain common extraction conditions for an effective and simultaneous extraction of both colorants.
- Apply the methodology of experimental mixture design and optimization using response surface methods and desirability functions.
- Validate the process of extraction using statistical tools.
- Determine the concentration of E100 and E133 in green cocktail cherries.

3. INTRODUCCIÓN

El color de los alimentos es una cualidad fundamental a la hora de evaluar, por parte del consumidor, la calidad del alimento y su aceptación. Es la característica que condiciona el primer juicio acerca de los alimentos, como bien indica la FAO/OMS, llegando al nivel de relacionar incluso el color con propiedades de calidad como la frescura o el grado de maduración.

Según el **Reglamento (CE) nº 1333/2008** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 [1], los colorantes son “sustancias que dan color a un alimento o le devuelven su color original; pueden ser componentes naturales de los alimentos y sustancias naturales que normalmente no se consumen como alimentos en sí mismas ni se emplean como ingredientes característicos de los alimentos”. Asimismo, considera colorantes “los preparados obtenidos a partir de alimentos y otros materiales comestibles naturales de base mediante una extracción física, química, o física y química, conducente a la separación de los pigmentos respecto de los componentes nutritivos o aromáticos”. Dicho Reglamento legisla la utilización de los colorantes para asegurar de este modo la salud del consumidor y las normas para su etiquetado.

Este tipo de aditivos han sido utilizados desde la antigüedad tanto en productos de confitería como en vinos. Su uso se fue generalizando llegando a utilizarse de forma fraudulenta para ocultar la falta de calidad de los alimentos o incluso alimentos en mal estado. En la actualidad, el uso de estos compuestos permite a la industria alimentaria conseguir tanto la uniformidad en los distintos lotes de fabricación como la corrección de la variabilidad natural de las materias primas y las posibles modificaciones derivadas de su procesado, como tratamientos mecánicos o térmicos, cambios en la acidez que implican un cambio del color, o por efecto de la luz. Sin embargo, es necesario regular su utilización para evitar el uso indebido de algunas sustancias que pueden resultar perjudiciales para la salud, así como que se produzcan fraudes y adulteraciones.

Por este motivo, en 1994, dada la necesidad de una regulación del uso de aditivos, se publicó la **Directiva 94/36/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994 [2], sobre los colorantes utilizados en los productos alimenticios, con objeto de armonizar las legislaciones de los distintos Estados miembros. En 2011, se publicó un nuevo reglamento, **Reglamento (UE) nº 1129/2011** de la Comisión del 11 de noviembre de 2011, donde se encuentra la lista vigente de colorantes autorizados [3]. La clasificación más común de estos compuestos establece dos grupos: los colorantes naturales o exentos de certificación, y los colorantes artificiales o sujetos a certificación.

Los colorantes naturales reciben este nombre debido a que se extraen de materiales naturales, pudiendo ser de origen vegetal, mineral o animal. La problemática en la tecnología alimentaria que produce este tipo de colorantes es su baja estabilidad frente a la luz, que produce cambios en el sabor y olor, la reducida capacidad de tinción, además de la variabilidad en su composición en función de condiciones climáticas, geográficas, etc. Todo ello dificulta la obtención de productos uniformes y estables a nivel industrial, sin embargo, presentan una mayor inocuidad frente a los colorantes artificiales.

Los colorantes artificiales certificados para su uso en alimentos incluyen tanto los colorantes azoicos como los no azoicos. Estos colorantes presentan mayor estabilidad frente a factores externos, procesos de producción, etc. Debido a la existencia de grupos sulfónicos en su composición, son solubles en agua y por ello fáciles de utilizar, normalmente en forma de sales sódicas, líquidos o materiales densos [4]. Además de dar lugar a colores más estables, permiten conseguir lotes con coloración más uniforme, ya que se elimina el factor de variabilidad que se encuentra en la composición de los colorantes naturales.

Sin embargo, estos colorantes plantean un problema mayor que la estabilidad del color, un número elevado de ellos tiene demostrada una cierta toxicidad crónica [5]. Por esta razón, se ha prohibido el empleo de muchos de ellos o se ha limitado la cantidad en que algunos se pueden añadir a distintos alimentos, procurando utilizar colorantes de menor riesgo, siempre que sea posible.

Por ejemplo, en el caso de las cerezas de cóctel, su elaboración consiste en el blanqueamiento de estas para eliminar su pigmento natural, la antocianina, para posteriormente volver a colorearlas con los colorantes deseados, que proporcionen una coloración más intensa y permanente [6]. El colorante que se utiliza habitualmente para tal fin, en cerezas de cóctel rojas, es la eritrosina (E127), que es un colorante sintético no azoico de color rojo-violeta. Aunque la adición de E127 estaba permitida en una gran variedad de alimentos, en la actualidad su uso está restringido en la Unión Europea a cerezas de cóctel o confitadas y a cerezas bigareaux en jarabe o en cóctel. Para las primeras, la legislación europea establece un límite máximo de 200 mg kg^{-1} y de 150 mg kg^{-1} para las segundas [3]. La limitación en su uso deriva del hecho de que el E127 es relativamente fotosensible y al presentar 4 átomos de yodo en su molécula, sus productos de degradación fotoquímica y bioquímica pueden resultar tóxicos [7].

Con objeto de reducir la ingesta de este colorante por parte del consumidor, se han introducido en el mercado unas cerezas de cóctel de color verde, que no contienen E127 [7]. En la presente memoria, se han analizado cerezas de cóctel verdes en cuyo etiquetado se indica el uso de curcumina (E100), que es un colorante natural, y de azul brillante FCF (E133), que es un colorante sintético no azoico. Un estudio reciente [7] ha demostrado que el color del E133 es más estable a luz que el del E127, y dada la menor toxicidad del primero (la ingesta diaria admitida del E133 es de 6 mg kg^{-1} , frente a los $0-0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ del E127), el E133 resulta una alternativa para la elaboración de cerezas de cóctel.

El **E133** (Figura 1) es un colorante de color azul, termoestable, muy soluble en agua y parcialmente insoluble en etanol. Se considera un colorante prácticamente inocuo debido a su escasa absorción en el tracto digestivo, a su vez, destaca la menor Ingesta Diaria Admisible (6 mg kg^{-1}) frente al resto de colorantes artificiales [7]. Sin embargo, se ha verificado que en dosis elevadas se puede producir su acumulación en vasos linfáticos y en los riñones, produciendo importantes problemas para la salud del consumidor. Por ello, se han establecido límites en su empleo en la industria

alimentaria en la UE, en concreto, dosis máximas de 200 mg kg^{-1} en conservas de frutos rojos [3].

Por otro lado, el **E100** (Figura 1) pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos presentes de forma natural en los rizomas de la planta *Cúrcuma* (*Cúrcuma longa*), es estable hasta los $100 \text{ }^\circ\text{C}$ y tiene color amarillo. Es una molécula anfipática, por lo que es parcialmente soluble en agua y en disolventes orgánicos. Se considera un aditivo inocuo, pero en personas con predisposición a reacciones alérgicas, puede producir enrojecimiento cutáneo y posibles edemas. La Ingesta Diaria Admisible de E100 no debe superar 1 mg kg^{-1} y por ello, la UE establece límites máximos para este aditivo en diversos alimentos, aunque no en el caso de las cerezas de cóctel [3].

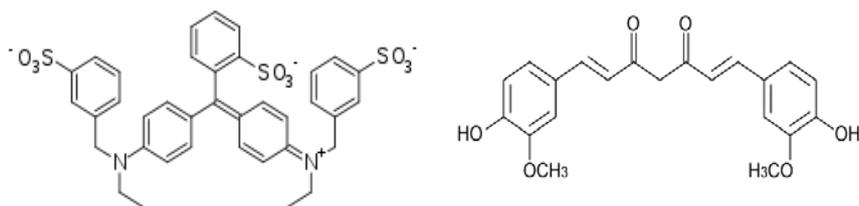


Figura 1. Estructura química del azul brillante FCF o E133 (izquierda) y curcumina o E100 (derecha).

En cuanto a la determinación de estos colorantes en alimentos, la separación y caracterización de los mismos se basa principalmente en el empleo de métodos espectrofotométricos y cromatográficos, siendo la cromatografía líquida en sus diferentes modalidades muy utilizada al permitir la separación, identificación y cuantificación de los colorantes. En concreto, la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-visible se ha empleado para la determinación de colorantes tanto naturales como sintéticos en diversos tipos de matrices [8, 9]. Otros métodos analíticos empleados en la determinación de estos colorantes son la cromatografía líquida con detección visual [10], métodos electroforéticos [11, 12] y métodos electroquímicos, como la voltamperometría o polarografía [13], que resultan más económicos que HPLC.

En este trabajo se aborda la determinación de E133 y E100 en cerezas de cóctel verdes mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible como técnica alternativa rápida, asequible y económica frente a las indicadas anteriormente. Se optimiza el procedimiento de extracción, considerando tanto la mezcla de disolventes a utilizar como las condiciones experimentales. Una vez puesto a punto y validado el procedimiento de análisis, se lleva a cabo la determinación de ambos colorantes en cerezas de cóctel verdes comerciales.

4. TEORÍA

4.1. Metodología de superficie de respuesta: diseños Doehlert

En la optimización de procesos industriales y procedimientos experimentales, es habitual que no se conozca el modelo teórico que relaciona las variables controlables (factores) con la propiedad o característica (respuesta) a optimizar. La metodología de superficie de respuesta [14] proporciona técnicas matemáticas y estadísticas para establecer un modelo empírico y garantizar su adecuación a los datos experimentales.

Para la obtención de ese modelo empírico, hay que seguir una serie de pasos. En primer lugar, se deben elegir los factores experimentales, y definir el dominio experimental de interés. Posteriormente, se formula un modelo empírico, asumiendo que representa bien la evolución de la respuesta en estudio. Una vez hecho esto, se plantea un diseño experimental que permita ajustar correctamente el modelo propuesto para poder calcular la respuesta en cualquier punto del dominio experimental con calidad suficiente. A continuación, según el plan experimental, se obtiene la respuesta en cada punto del diseño y se estiman los coeficientes del modelo, que se debe validar. Por ejemplo, la ecuación del modelo empírico completo para un diseño con tres factores sería:

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 \quad (1)$$

Entre los diseños de experimentos que se han desarrollado para ajustar modelos matemáticos de orden dos se encuentran los diseños centrales compuestos, Doehlert, Box-Benhken, etc. En un diseño Doehlert, los puntos experimentales se generan a partir de un simplex de k dimensiones (sólido regular con $k+1$ vértices); para dos factores es un triángulo. Mediante yuxtaposición del simplex, es posible cubrir todo el espacio experimental, de modo que los vértices forman una rejilla de puntos equiespaciados. El diseño para dos factores está formado por los vértices de un hexágono y su punto central. En la Figura 2 se muestran los puntos experimentales correspondientes a un diseño Doehlert para dos y tres factores.

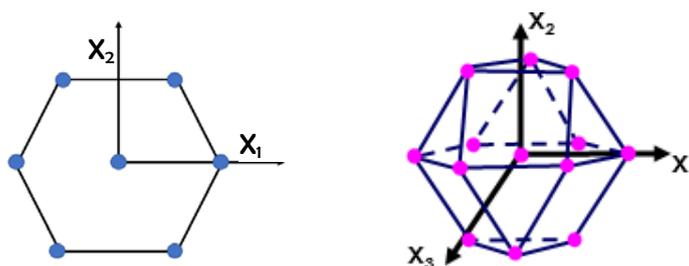


Figura 2. Diseños Doehlert para dos (izquierda) y tres (derecha) factores.

La distribución uniforme de los puntos de los diseños Doehlert hace que resulten muy útiles para la experimentación secuencial ya que facilitan el ampliar o desplazar el diseño inicial. Como se observa en la Figura 2, el número de niveles es diferente para cada factor, lo cual es interesante cuando alguno de los factores presenta dificultades para ser modificado. Además, estos diseños resultan más eficaces que otros ampliamente utilizados ya que requieren un menor número de experimentos. Se pueden encontrar múltiples aplicaciones de estos diseños en optimizaciones [15, 16].

4.2. Diseños de mezclas

En la industria alimentaria se elaboran muchos productos a través de formulaciones que involucran la mezcla de dos o más ingredientes, o procedimientos que implican el uso de dos o más componentes en el procesado de algunos alimentos. Por otro lado, en el control de calidad de muchos productos es necesario emplear mezclas de disolventes, para realizar extracciones, aplicar métodos de cromatografía de líquidos, etc. En todos estos casos, la proporción de cada 'ingrediente' puede tener un significativo efecto en las características del producto o resultado final. Por ello, es importante encontrar la mejor mezcla de 'ingredientes', mediante el empleo de herramientas estadísticas como el diseño de mezclas. El diseño de mezclas se basa

en estudiar, a través de un modelo matemático, el efecto que tiene la variación de las proporciones relativas de los componentes de una mezcla sobre una propiedad o característica (respuesta).

Algo que caracteriza los diseños de mezclas, frente a otros tipos de diseños de experimentos es que, en general, la proporción de cada componente puede variar entre el 0 y el 100%, y que la suma de los porcentajes de los componentes es el 100%. Esta última restricción implica que los componentes de la mezcla o factores experimentales no son independientes; la modificación de la proporción de alguno de los componentes afecta al resto.

Dentro del dominio experimental, el espacio de la mezcla puede ser una región simplex regular, o puede variar en función de la existencia de posibles restricciones adicionales sobre la proporción de los componentes de las mezclas. En función de las restricciones, el dominio experimental puede mantener la forma simplex, pero con un menor tamaño, o se pueden dar regiones poliédricas irregulares denominadas regiones de vértices extremos.

Una vez impuestas las restricciones, se debe verificar la coherencia de dichas limitaciones y la viabilidad del dominio experimental de interés [17].

En 1958 Scheffe publicó la base para aplicar el modelo de superficie de respuesta al análisis de mezclas. Introdujo como modelos polinómicos ciertos diseños experimentales, los diseños simplex-enrejado, con tantos puntos como términos tiene el polinomio. Por ejemplo, el modelo cúbico especial para una mezcla de tres componentes viene dado por el modelo de la Ecuación (2). A diferencia de los modelos para superficies de respuesta de otros tipos de diseños, los modelos en los diseños de mezclas carecen de términos independientes y de términos cuadráticos o cúbicos puros.

$$y = b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (2)$$

4.3. Optimización multirrespuesta: función de deseabilidad

Cuando se desean optimizar varias respuestas, pueden surgir diversas contradicciones para llevar a cabo el proceso de optimización conjunta, por ello, en 1980 Derringer y Suich desarrollaron la función de deseabilidad, herramienta estadística que facilita la optimización simultánea de las respuestas de interés [18]. El método consiste en establecer una función de deseabilidad individual (d_i) para cada variable respuesta (y_i) y con ellas definir una deseabilidad global (D). La media geométrica ponderada de las funciones de deseabilidad individuales, da lugar a la función de deseabilidad global (Ecuación 3). Entonces, el objetivo es maximizar esta última y encontrar el punto óptimo de las condiciones experimentales donde se optimizan todas las respuestas.

$$D = \sqrt[p]{d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times d_3^{p_3}} \quad (3)$$

Cada función de deseabilidad (tanto individual como global) varía entre los valores 0 y 1. Valores de deseabilidad máxima, 1, implican un valor aceptable para la respuesta estimada (y_i); por el contrario, si la deseabilidad es igual a 0, la respuesta toma un valor no deseado.

5. EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos y muestras

Se han empleado los reactivos curcumina (mezcla de curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina; CAS: 458-37-7) con una pureza del 98% y azul brillante FCF (sal disódica de erioglaucina, CAS: 3844-45-9), de Acros Organics. Como disolventes extractantes se han utilizado acetona, etanol (96%) y acetonitrilo de VWR BDH Chemicals.

En relación a las muestras problema, se han analizado cerezas de cóctel verdes de una marca comercial, ya que se trata de un producto novedoso que está comenzando a distribuirse como alternativa más saludable que las cerezas rojas.

5.2. Materiales e instrumentación

Las medidas espectrofotométricas se han realizado con un espectrofotómetro UV-visible *Cary 50 Conc* de *Varian*, tomando valores de absorbancia en intervalos de 1 nm, entre las longitudes de onda de 380 y 800 nm. Los extractos de las cerezas se han filtrado previamente a la medida espectrofotométrica, para ello se han utilizado filtros de Nylon con tamaño de poro de 0.22 μm , PP (polipropileno) de 0.45 μm y PVDF (fluoruro de polivinilideno) de 0.45 μm .

En la optimización de la extracción de colorantes, se utilizaron los siguientes equipos: baño de ultrasonidos (P-selecta), agitador magnético (IKA colorsquid) y agitador vórtex (IKA genius 3). El tratamiento de datos se llevo a cabo con varios programas informáticos. Con Nemrodw [19] se realizaron los diseños experimentales y se obtuvo la función de deseabilidad. Statgraphics [20] se utilizó para estimar los modelos de regresión. Y por último, Detarchi [21] se empleó para calcular el límite de decisión y la capacidad de detección.

5.3. Procedimiento experimental

Para llevar a cabo la extracción de estos colorantes en las muestras de cereza, se pesaron 3 gramos de cereza, triturada sin el exceso de almíbar y homogeneizada con un molino de cuchillas, y se pusieron en contacto con cierto volumen de extractante.

En la extracción mediante ultrasonidos, se mantuvo la mezcla en agitación durante un tiempo determinado favoreciendo la ruptura de las paredes celulares de la cereza, y de este modo, facilitando la extracción de los colorantes. Transcurrido este tiempo, se filtró la mezcla con papel de filtro y se recogió el extracto (Figura 3).

Para evitar la presencia de partículas en suspensión, se filtró de nuevo el líquido obtenido a través de un filtro con tamaño de poro del orden de micrómetros. Se registró el espectro del filtrado obtenido mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible.



Figura 3. Procedimiento experimental: agitación en ultrasonidos y filtrado para extraer los colorantes de las muestras de cerezas.

En las extracciones utilizando el agitador vórtex y el agitador magnético, la mezcla de cerezas y extractante se agita durante cierto tiempo, y luego se procede con el extracto como se ha indicado en la extracción con ultrasonidos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudios previos

Se planteó la hipótesis de que utilizar mezclas de disolventes podría incrementar la eficacia de la extracción simultánea de los dos colorantes en las cerezas de cóctel. Por ello, en una primera etapa de la experimentación se estudió la solubilidad de los colorantes E100 y E133 en distintos disolventes habitualmente utilizados con este fin (agua, etanol, acetona y acetonitrilo), así como los espectros correspondientes. Para este análisis, se prepararon disoluciones de 100 mg L^{-1} de cada colorante en cada disolvente. La Figura 4 muestra las disoluciones obtenidas para los dos colorantes en etanol, acetona y acetonitrilo. Se puede observar cómo, a simple vista, la intensidad de color varía mucho para el E133 en función del disolvente, debido a la diferencia de solubilidad respecto a estos. Siendo el E133 parcialmente soluble en acetonitrilo, y en menor medida en acetona, y totalmente soluble en etanol, como bien se demostrará en los resultados de optimización de la mezcla extractante.



Figura 4. Disoluciones de los colorantes E100 y E133 en los distintos disolventes orgánicos.

La Figura 5 muestra los espectros registrados para los dos colorantes en los cuatro disolventes considerados. Como se puede observar en dicha figura, el colorante E133 presenta dos bandas de absorción, centradas aproximadamente en 620 nm y en 420 nm , correspondientes con las regiones del azul y el amarillo respectivamente, por lo que el colorante E133, dentro de su composición, presenta un grupo cromóforo que

absorbe en la región espectral del amarillo. Además, no se observan desplazamientos de los máximos de pico según el disolvente utilizado.

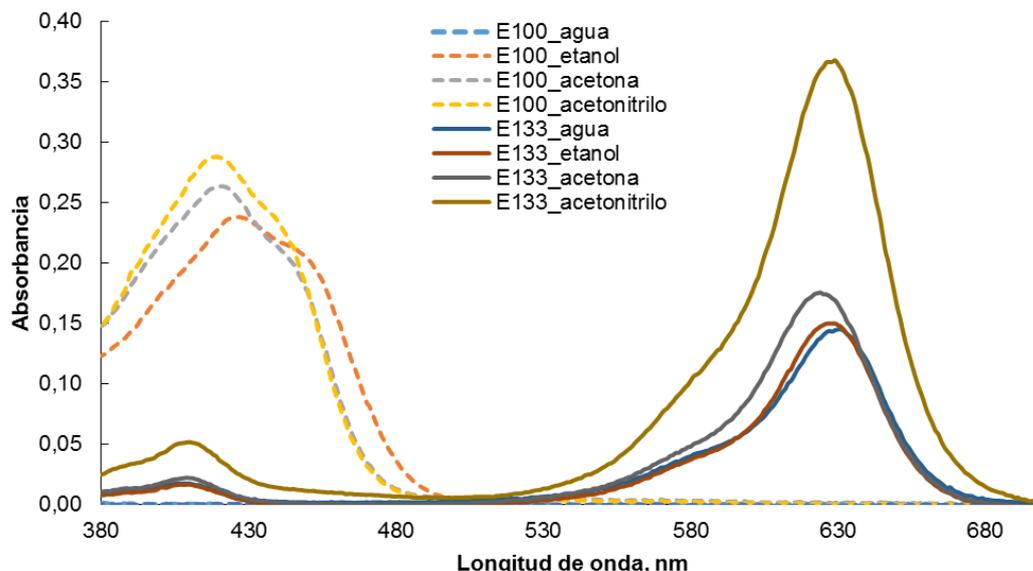


Figura 5. Espectros de absorción molecular del E100 y el E133 en distintos disolventes (100 mg L^{-1}).

En el caso del colorante E100, no se observa ninguna señal espectral en la disolución acuosa lo que pone de manifiesto la escasa solubilidad de este aditivo en agua. Sin embargo, el resto de los disolventes sí que podrían resultar eficaces en el proceso de extracción. Por otro lado, el máximo de la banda de absorción del E100 en etanol se encuentra desplazado respecto de los máximos de pico en el resto de los disolventes. Esto puede suponer un problema si se utiliza la absorbancia obtenida en el máximo de pico para hacer comparaciones entre extracciones realizadas con diferentes mezclas de disolventes.

Visto que el desplazamiento de la banda para el E100 se produce en etanol puro, para evaluar si este efecto tiene lugar también en mezclas que contengan cierto porcentaje de etanol, se han preparado disoluciones de este colorante en las mezclas binarias que se muestran en la Tabla 1 y se han registrado los espectros correspondientes.

Tabla 1. Mezclas binarias para el estudio de los espectros del E100.

Mezclas	Acetona (%)	ACN (%)	EtOH (%)	Agua (%)	Mezclas	Acetona (%)	ACN (%)	EtOH (%)	Agua (%)
1	20	0	80	0	6	0	0	80	20
2	30	0	70	0	7	0	90	0	10
3	0	20	80	0	8	0	80	0	20
4	0	30	70	0	9	90	0	0	10
5	0	0	90	10	10	80	0	0	20

Se observa que para las disoluciones en las mezclas de agua con acetona (mezclas 9 y 10) y con acetonitrilo (mezclas 7 y 8) se tienen espectros similares (Figura 6b) a los que se obtienen con los disolventes puros. Sin embargo, la combinación de agua con etanol (mezclas 5 y 6) da lugar a una disminución de la banda de absorción cuya forma espectral cambia respecto al patrón típico que siguen el resto de muestras,

llegando casi a desaparecer cuando el porcentaje de agua en la mezcla aumenta (mezcla 6).

En el caso del etanol, se comprueba que la combinación con el resto de disolventes (mezclas 1, 2, 3 y 4) da lugar a un pico cuyo máximo de absorción no sufre desplazamiento (Figura 6a). Con ello se puede ver que el máximo porcentaje de etanol con el que no se produce desplazamiento de la banda espectral es del 80%. Por lo tanto, a la hora de estudiar las mezclas de los distintos disolventes para optimizar la extracción de los colorantes, se impondrá como restricción etanol \leq 80%. Asimismo, debido a los problemas que presenta el agua como disolvente para el E100, se decide prescindir de ella como extractante.

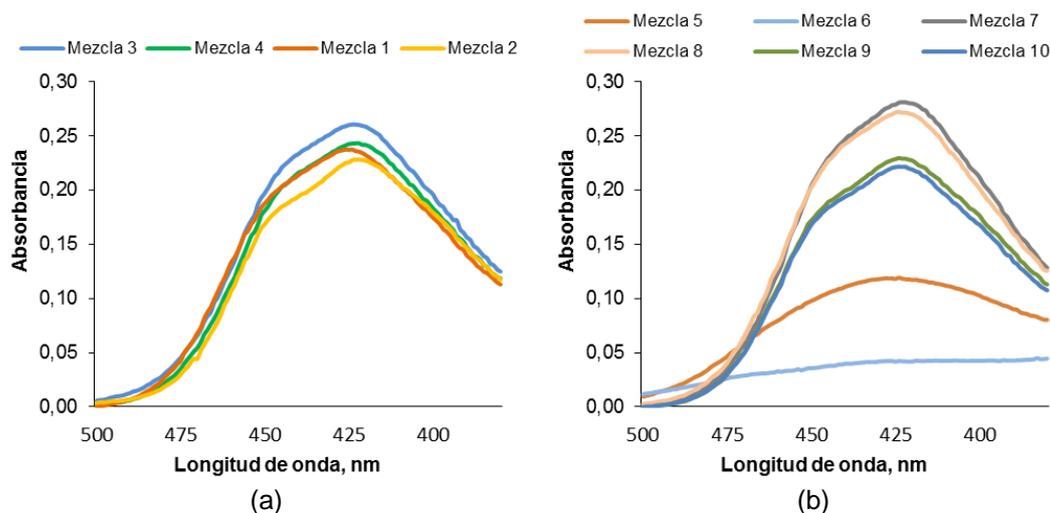


Figura 6. Espectros de absorción del E100 obtenidos con las mezclas binarias de la Tabla 1.

Como ya se ha indicado en el apartado Experimental, las muestras se filtraban antes de registrar los espectros para evitar la presencia de partículas en suspensión. Inicialmente, esta tarea se realizaba utilizando filtros de Nylon de 0.45 μm de tamaño de poro. Se observó que el colorante E100 pasaba a través del filtro sin problemas, sin embargo, el colorante E133 quedaba retenido en el mismo. Esto se debe a que el Nylon es un polímero del grupo de las poliamidas que tiene afinidad por el colorante E133, y por este motivo éste último quedaba retenido al ser filtrada la muestra.

Para ver el efecto de distintos materiales en esta filtración, se filtraron disoluciones de E133 a través de filtros de papel, de PVDF de 0.45 μm y de PP de 0.22 μm . Los espectros registrados en cada caso se muestran en la Figura 7.

En ningún caso se observó retención del E133 en los filtros, ni tampoco del E100, por lo que se decidió trabajar, a lo largo de toda la experimentación, con filtros de PP, dado que los filtros de PVDF no son resistentes a la acetona y acetonitrilo empleados como disolventes.

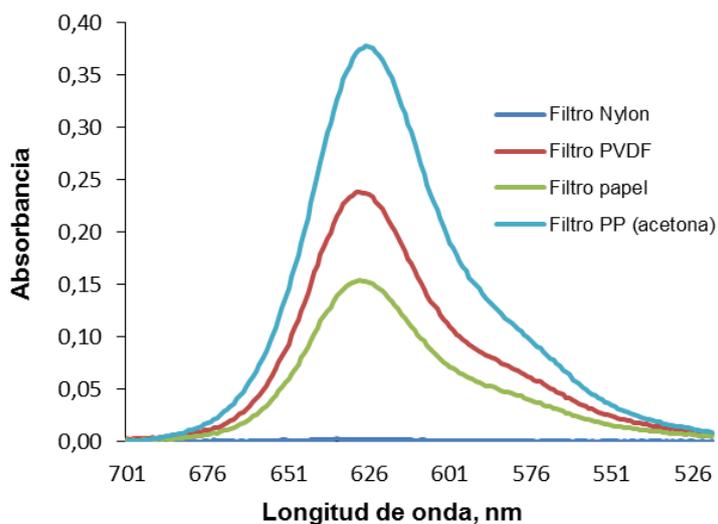


Figura 7. Espectros obtenidos para disoluciones de E133 filtradas con filtros de distinto material.

6.1. Optimización de la mezcla de extracción

Para llevar a cabo la optimización de la mezcla para la extracción de los colorantes E100 y E133, se realiza un diseño experimental de mezclas. El objetivo de este diseño experimental es conseguir la mezcla óptima que sea capaz de extraer eficazmente y de forma simultánea ambos colorantes de las cerezas de cóctel. Los disolventes o factores experimentales que se han considerado en la optimización han sido acetona (X_1), acetonitrilo (X_2) y etanol (X_3). Para evitar desplazamientos en los espectros del E100 que no permitirían realizar comparaciones de absorbancias en todo el dominio experimental, se establece la restricción de que el porcentaje de etanol no supere el 80%, los otros dos disolventes pueden variar del 0 al 100%. Dentro de este dominio experimental se pretende ajustar el modelo cúbico especial de la ecuación (2).

El diseño experimental utilizado es un diseño de mezclas de vértices extremos con experimentos en los vértices, los centros de las aristas, el punto central y los puntos de control, se trata de un diseño similar a los diseños simplex-centroide de Scheffé. En este diseño se incluyeron 3 réplicas en el centro de gravedad, por lo que el plan experimental consta de los 19 experimentos que aparecen en la Tabla 2. En la Figura 8 se muestra la variación de la función de la varianza en el dominio experimental; el hecho de que la varianza sea siempre menor de 1 garantiza la calidad de la predicción de la respuesta en cualquier punto del dominio experimental.

En las condiciones de extracción correspondientes a cada experimento de la Tabla 2 se llevó a cabo una extracción (con 3 g de cereza triturada y homogeneizada) utilizando el equipo de ultrasonidos, durante un período de tiempo de 5 minutos. Finalmente, los extractos se filtraron y se realizó la medida espectrofotométrica. La absorbancia registrada en el máximo de absorción de las bandas espectrales del E133 (627 nm) y el E100 (425 nm) fue la respuesta considerada en este diseño. En el caso del E100, la absorbancia se tomó a una longitud de onda ligeramente mayor de la del máximo de absorción para evitar la contribución del E133 en la región del amarillo.

Tabla 2. Plan experimental para la optimización de la mezcla de extracción.

Plan experimental				Respuestas	
Exp.	Acetona (%)	ACN (%)	EtOH (%)	Abs E100	Abs E133
1	1.000	0	0	0.373	0.011
2	0.300	0	0.700	0.399	0.023
3	0	1.000	0	0.198	0.016
4	0	0.300	0.700	0.360	0.034
5	0.650	0	0.350	0.366	0.016
6	0.500	0.500	0	0.215	0.016
7	0.150	0.150	0.700	0.335	0.027
8	0	0.650	0.350	0.251	0.026
9	0.325	0.325	0.350	0.287	0.023
10	0.325	0.325	0.350	0.287	0.024
11	0.325	0.325	0.350	0.308	0.030
12	0.325	0.325	0.350	0.312	0.020
13	0.663	0.163	0.175	0.352	0.018
14	0.313	0.163	0.525	0.322	0.024
15	0.163	0.663	0.175	0.193	0.017
16	0.200	0	0.800	0.360	0.033
17	0	0.200	0.800	0.325	0.044
18	0.100	0.100	0.800	0.362	0.039
19	0.163	0.313	0.525	0.316	0.031

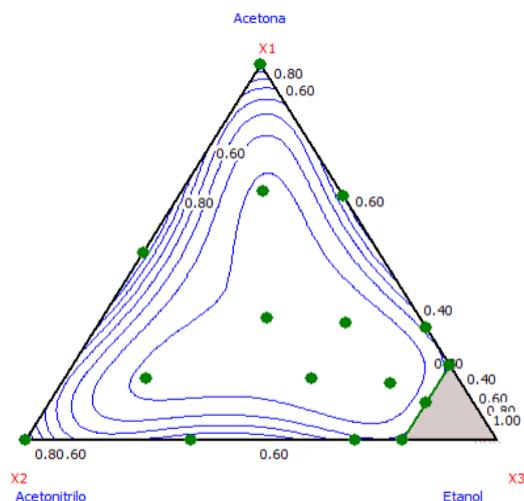


Figura 8. Variación de la función de varianza dentro del dominio experimental

Con las respuestas obtenidas en el diseño experimental se lleva a cabo el ajuste del modelo de la ecuación (2) para las dos respuestas. En primer lugar, se validan los modelos a través del test de significación (H_0 : el modelo no es significativo; H_a : el modelo es significativo) y el test de fallo de ajuste (H_0 : el modelo no tiene fallo de ajuste; H_a : sí lo tiene). La Tabla 3 recoge el análisis de la varianza (ANOVA) correspondiente a cada uno de los modelos, donde se muestran los niveles de probabilidad de ambos tests.

Se puede concluir que ambos modelos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%; la significación del primer test en ambos casos es menor del 5%, por lo que se debe rechazar la hipótesis nula. Por otro lado, no presentan fallo de ajuste a ese nivel de confianza, ya que el nivel de significación del test correspondiente es mayor del 5%, de este modo, no hay evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula.

Tabla 3. Análisis de la varianza de los modelos ajustados para los dos colorantes.

Colorante	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Significación %
E100	Regresión	0.0594	6	0.0099	20.387	< 0.01
	Residuos	0.0058	12	0.0005		
	Fallo de ajuste	0.0053	9	0.0006	3.287	17.8
	Error	0.0005	3	0.0002		
	Total	0.0653	18			
E133	Regresión	0.0012	6	$1.98 \cdot 10^{-4}$	14.391	< 0.01
	Residuos	$1.65 \cdot 10^{-4}$	12	$1.37 \cdot 10^{-5}$		
	Fallo de ajuste	$1.12 \cdot 10^{-4}$	9	$1.25 \cdot 10^{-5}$	0.708	69.8
	Error	$5.28 \cdot 10^{-5}$	3	$1.76 \cdot 10^{-5}$		
	Total	0.0014	18			

La bondad de ajuste de los modelos de regresión múltiple se puede evaluar a través del coeficiente de determinación, R^2 , que establece el porcentaje de variabilidad de la respuesta que explica el modelo. En el caso del colorante E100, el modelo explica el 91.1% de la variación de la variable respuesta, mientras que, para el E133, el modelo explica el 87.8% de la variación de la respuesta.

Asimismo, se analizan los residuos estudentizados de ambos ajustes. Por un lado, se analiza la posible presencia de datos anómalos a través de dichos residuos (Figura 9). No se observan residuos anormalmente grandes (con residuos, en valor absoluto, superiores a 2.5) por lo que se concluye que no hay ningún dato anómalo. Por otro lado, se comprueba gráficamente si los residuos siguen una distribución normal (Figura 9); en ambos casos los residuos se encuentran alineados, por lo que se concluye que siguen una distribución normal.

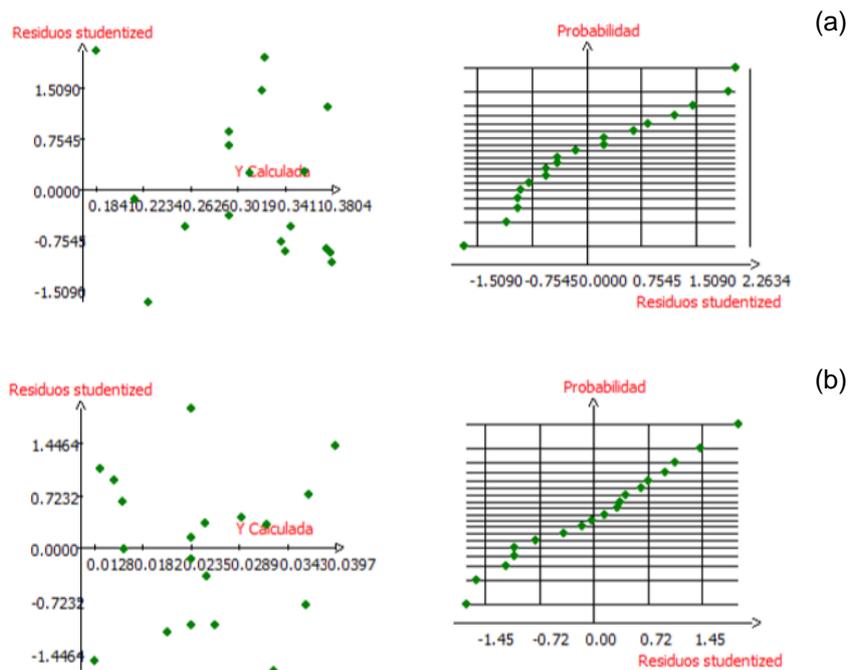


Figura 9. Residuos estudentizados y gráficos de normalidad correspondientes al a) E100 y al b) E133.

Una vez comprobada la validez de los modelos, se estudian las superficies de respuesta ajustadas. Los coeficientes estimados en ambos ajustes se muestran en la Tabla 4. Los términos lineales son significativos en ambos casos (significación menor del 5%), además de la interacción entre la acetona y el acetonitrilo en el modelo E100, así como la interacción entre la acetona y el etanol en el del E133.

Tabla 4. Estimación y estadística de los coeficientes de los modelos ajustados para las respuestas (E100 y E133).

	Nombre	Coefficiente	F. Inflación	Desviación típica	t exp.	Signif %
E100	b1	0.380	2.58	0.021	18.11	<0.01
	b2	0.184	2.58	0.021	8.77	<0.01
	b3	0.374	8.02	0.028	13.05	<0.01
	b1-2	-0.265	3.16	0.106	-2.50	2.82
	b1-3	0.004	7.37	0.122	0.04	97.2
	b2-3	0.036	7.37	0.122	0.29	77.4
	b1-2-3	0.104	4.92	0.550	0.29	85.4
E133	b1	0.013	2.58	0.004	3.61	0.356
	b2	0.015	2.58	0.004	4.23	0.117
	b3	0.047	8.02	0.005	9.68	<0.01
	b1-2	0.009	3.16	0.018	0.49	63.6
	b1-3	-0.049	7.37	0.021	-2.39	3.42
	b2-3	-0.004	7.37	0.021	-0.19	85.6
	b1-2-3	0.090	4.92	0.092	0.97	35.1

La Figura 10 muestra las superficies de respuesta ajustadas y las curvas de nivel de ambos modelos, con el fin de conocer la mezcla extractante óptima para conseguir una extracción eficaz de los dos colorantes al mismo tiempo. En la Figura 10a, se

puede ver que el E100 tiene una mayor afinidad por el etanol y la acetona, ya que el máximo de absorbancia se encuentra a lo largo de la arista correspondiente a la mezcla binaria de ambos disolventes. En el caso del E133 (Figura 10b), se extrae más con una mezcla al 80% de etanol, pero junto con una cierta cantidad de acetonitrilo. Consecuentemente, sabiendo que ambos colorantes se extraen más eficazmente con mezclas de etanol al 80%, y a su vez, cada uno tenía cierta afinidad por la acetona o el acetonitrilo, se ha optado por una solución de compromiso y se ha seleccionado como mezcla extractante óptima: **80% etanol, 10% acetona y 10% acetonitrilo**.

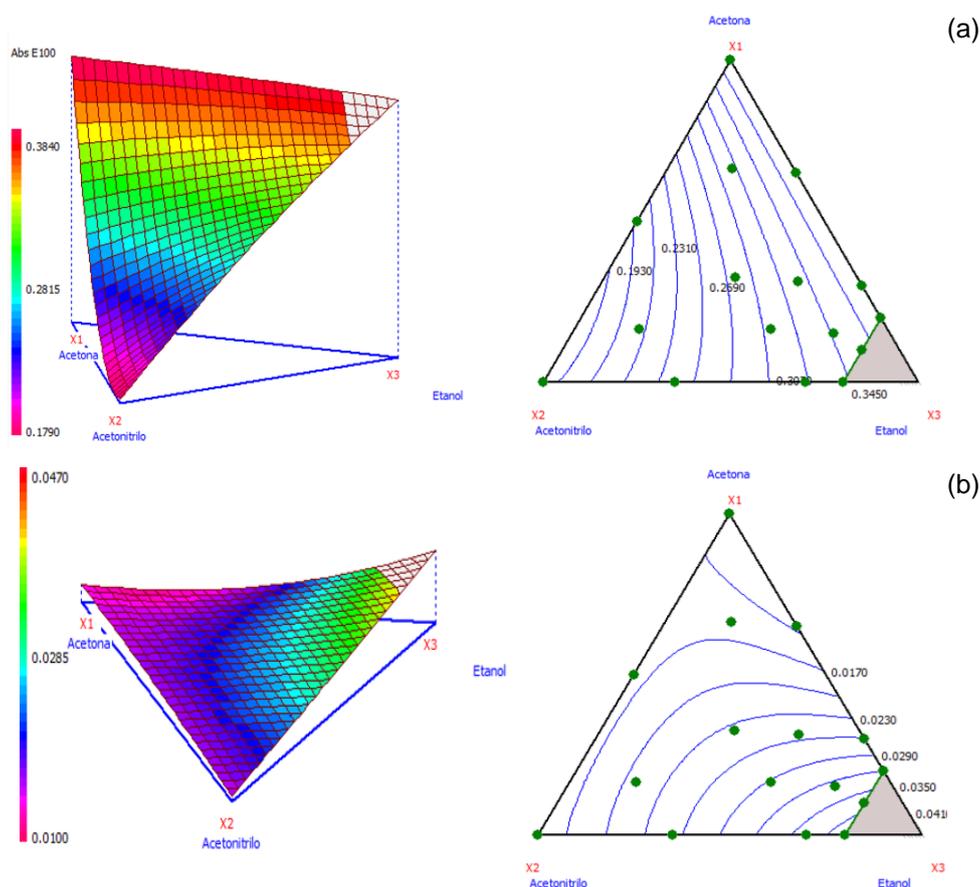


Figura 10. Superficie de respuesta y curvas de nivel para (a) E100 y (b) E133.

6.2. Optimización de las condiciones de extracción

Conocida la mezcla extractante óptima para la extracción simultánea de ambos colorantes, se ha llevado a cabo la optimización de las condiciones de extracción, variando 3 factores: tiempo de extracción, volumen de extractante y dispositivo de agitación. Como dispositivos se han considerado un sistema de agitación mediante ultrasonidos, un agitador vórtex y un agitador magnético (Figura 11).

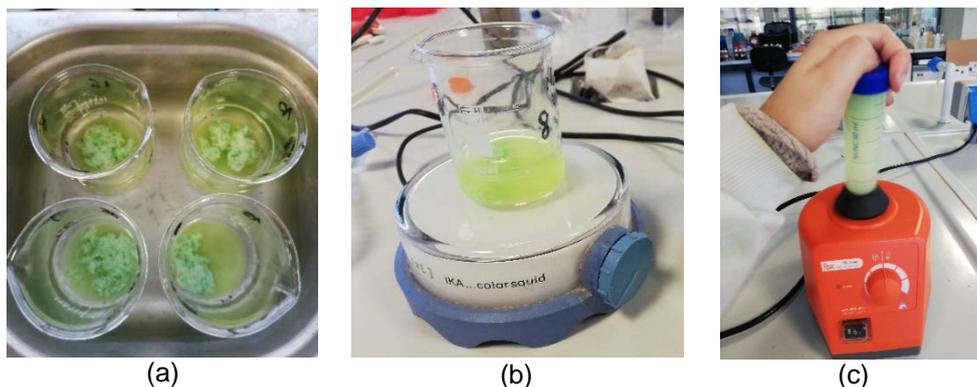


Figura 11. Dispositivos empleados en la optimización de las condiciones de extracción (a) ultrasonidos (b) agitador magnético y (c) agitador vórtex.

Para ajustar el modelo de segundo orden de la Ecuación (4) se ha utilizado el diseño Doehlert para tres factores que se muestra en la Figura 2. Consta de 13 experimentos y se han realizado, además, 2 réplicas del punto central. Los valores del punto central son 25 mL de volumen de extractante, 10 minutos de tiempo de extracción y extracción con ultrasonidos. El paso de variación para el volumen de extractante se ha fijado en 10 mL y para el tiempo de extracción en 10 min. El diseño experimental ha consistido en los 15 experimentos que se muestran en la Tabla 5.

En la codificación de los dispositivos, los términos 0,1 y -1 equivalen a los dispositivos de ultrasonidos, agitador vórtex y agitador magnético, respectivamente.

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 \quad (4)$$

Tabla 5. Plan experimental y respuestas del diseño Doehlert.

N°Exp	Volumen mL	Tiempo min	Dispositivo	E100 mg	E133 mg
1	35.0	10.0	0	0.7520	0.1090
2	15.0	10.0	0	0.7680	0.1300
3	30.0	18.7	0	0.7700	0.1180
4	20.0	1.3	0	0.7210	0.1090
5	30.0	1.3	0	0.5380	0.0920
6	20.0	18.7	0	0.9470	0.1490
7	30.0	12.9	1	0.6700	0.0850
8	20.0	7.1	-1	0.8200	0.1190
9	30.0	7.1	-1	0.7000	0.0960
10	25.0	15.8	-1	0.7930	0.0920
11	20.0	12.9	1	0.6420	0.0840
12	25.0	4.2	1	0.6270	0.0780
13	25.0	10.0	0	0.8270	0.1150
14	25.0	10.0	0	0.7410	0.1020
15	25.0	10.0	0	0.7368	0.1112

Al igual que en el caso anterior, es interesante observar que los valores de la función de varianza (Figura 12a) son <1 en todo el dominio experimental, lo que garantiza la calidad de la estimación de los coeficientes y de las predicciones que se realicen. Además, la función de varianza es rotatable, es decir, los valores de la función de la varianza son iguales para cualquier distancia del punto central dada.

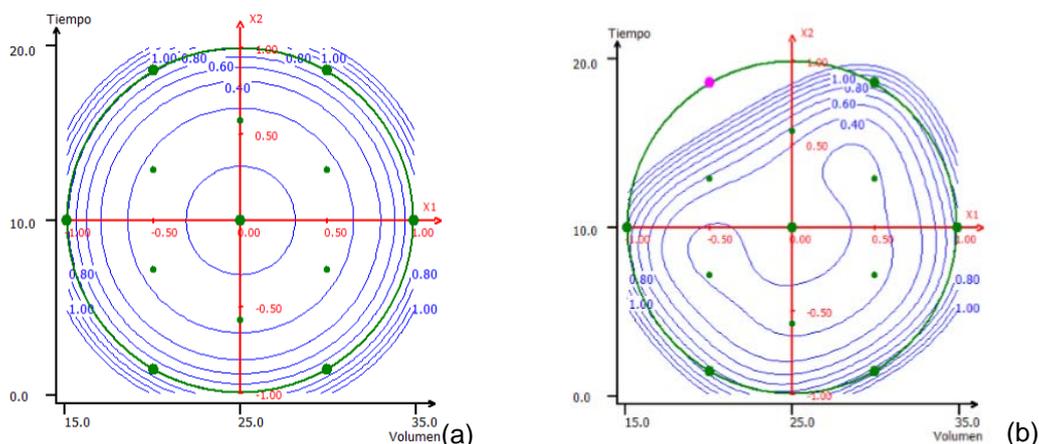


Figura 12. Variación de la función de varianza en el diseño Doehlert (dispositivo = 0; ultrasonidos) con (a) todos los experimentos y (b) sin el experimento anómalo.

Por otro lado, dado que el instrumento proporciona absorbancias y que éstas varían dependiendo del volumen de extractante utilizado en la extracción. Se han utilizado sendos modelos de calibrado para estimar los mg de E100 y E133 extraídos, que posteriormente se han considerado como las respuestas a optimizar. Las cantidades extraídas de ambos colorantes en los distintos experimentos del diseño se muestran en la Tabla 5.

A partir de las respuestas obtenidas, se ajusta el modelo de superficie de respuesta para cada colorante. El modelo para el E100 no presenta fallo de ajuste (nivel de significación 31.4%), pero no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% (nivel de significación 12.0%). Al ser un modelo no significativo, se estudian los residuos estudentizados por si hubiese algún punto anómalo que fuera el causante de la falta de significación del modelo. Se comprueba que la experiencia 6 (Tabla 5) tiene un residuo que se aleja ligeramente de la distribución normal, y por tanto se elimina del estudio. De este modo, se debe ajustar de nuevo el modelo con los experimentos restantes.

Se procede a la validación de los nuevos modelos. El análisis de la varianza (Tabla 6) muestra que ambos modelos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%, y que no presentan fallo de ajuste a ese nivel de confianza.

Tabla 6. Análisis de la varianza de los modelos ajustados para el E100 y el E133.

Colorante	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Significación (%)
E100	Regresión	0.094	7	0.011	8.269	0.997
	Residuos	0.037	6	0.001		
	Fallo de ajuste	0.032	4	0.001	0.262	88.2
	Error	0.005	2	0.003		
	Total	0.131	13			
E133	Regresión	0.0028	7	$3.94 \cdot 10^{-4}$	7.004	1.51
	Residuos	$3.37 \cdot 10^{-4}$	6	$5.63 \cdot 10^{-5}$		
	Fallo de ajuste	$2.48 \cdot 10^{-4}$	4	$6.20 \cdot 10^{-5}$	1.388	45.9
	Error	$8.94 \cdot 10^{-5}$	2	$4.47 \cdot 10^{-5}$		
	Total	0.0031	13			

El nuevo modelo para la respuesta del E100 explica el 90,6% de la varianza de ésta. En el caso del colorante E133, el modelo sin el dato anómalo explica el 89,1% de la variación en la respuesta. La función de varianza de este nuevo diseño continúa siendo menor de la unidad en todo el dominio experimental (Figura 12b).

Por otro lado, se han analizado los residuos estudentizados de ambos modelos. No se observan residuos anormalmente grandes, con residuos, en valor absoluto, superiores a 2.5 (Figura 13). Asimismo, observando la Figura 13, se puede decir que los residuos se encuentran alineados, y, por tanto, que siguen una distribución normal. Por lo que se concluye que no hay ningún dato anómalo.

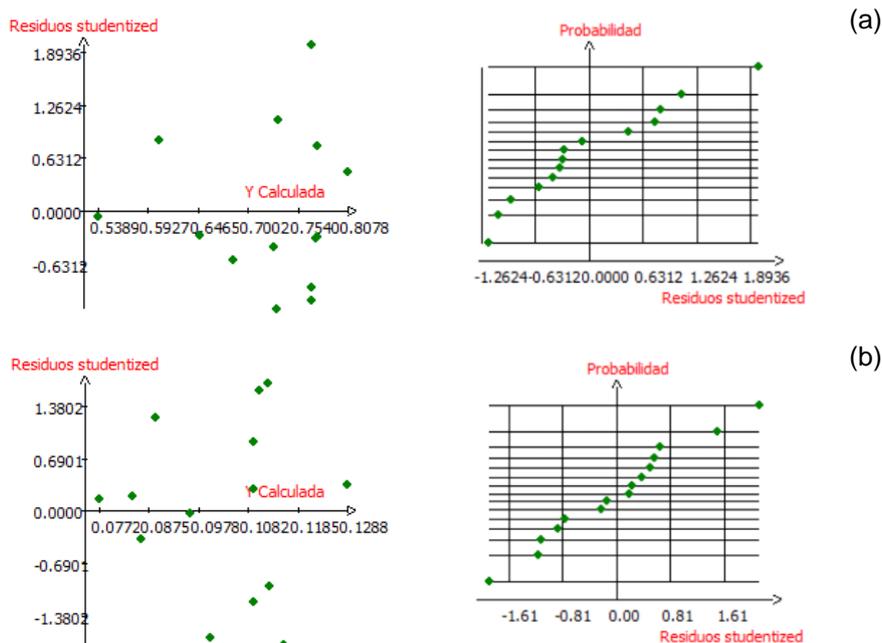


Figura 13. Residuos estudentizados y distribución de probabilidad de los residuos para (a) E100 y (b) E133.

Validados los modelos, se estudian las superficies de respuesta ajustadas. Los coeficientes estimados en ambos ajustes se muestran en la Tabla 7. En cuanto a los términos lineales en el modelo del E100 es significativo, con un nivel de confianza del 95%, el coeficiente correspondiente al dispositivo, además de la interacción entre el volumen de extractante y el tiempo de extracción. En el caso del modelo para el E133, igual que en el caso anterior, el coeficiente del dispositivo es estadísticamente significativo a ese mismo nivel de confianza.

Tabla 7. Coeficientes de los modelos ajustados y estadísticos.

	Nombre	Coefficiente	F. inflación	Desviación típica	t. exp	Signif.%
E100	b0	0.768		0.021	36.69	<0.01
	b1	-0.020	1.14	0.020	-1.02	34.7
	b2	0.039	1.33	0.023	1.66	14.9
	b3	-0.076	1.00	0.018	-4.21	0.563
	b1-1	-0.015	1.15	0.033	-0.46	65.9
	b2-2	-0.130	1.37	0.039	-3.33	1.58
	b3-3	-0.053	1.18	0.032	-1.67	14.7
	b1-2	0.195	1.36	0.053	3.67	1.04
E133	b0	0.109		0.004	25.27	< 0.01
	b1	-0.008	1.14	0.004	-1.95	9.9
	b2	0.003	1.33	0.005	0.57	59.2
	b3	-0.012	1.00	0.004	-3.27	1.71
	b1-1	0.011	1.15	0.007	1.69	14.2
	b2-2	-0.010	1.37	0.008	-1.27	25.0
	b3-3	-0.026	1.18	0.007	-3.92	0.780
	b1-2	0.022	1.36	0.011	1.95	9.9

La Figura 14 muestra las curvas de nivel de los modelos para el E100 y el E133. En los distintos gráficos se ha fijado el factor del dispositivo ya que no es posible representar los tres factores a la vez.

Se puede ver que los equipos de ultrasonidos y agitador magnético son los más eficaces en la extracción de los dos colorantes, siendo los que mayor cantidad de colorante extraen. La pauta de las curvas de nivel es similar para los tres dispositivos en el caso el E100. Se encuentran dos zonas de extracción alta que implican extraer con menos volumen durante menos tiempo o extraer con más volumen durante más tiempo. En el caso del E133, la pauta de las curvas de nivel es similar para la extracción con ultrasonidos y con agitador magnético y varía ligeramente cuando la extracción se realiza con el agitador vórtex. En los dos primeros casos, las condiciones óptimas de extracción se corresponden con volúmenes y tiempo de extracción bajos.

Con el fin de obtener unas condiciones de extracción comunes para ambos colorantes se emplea, como método de optimización multirrespuesta, la función de deseabilidad (ecuación 3).

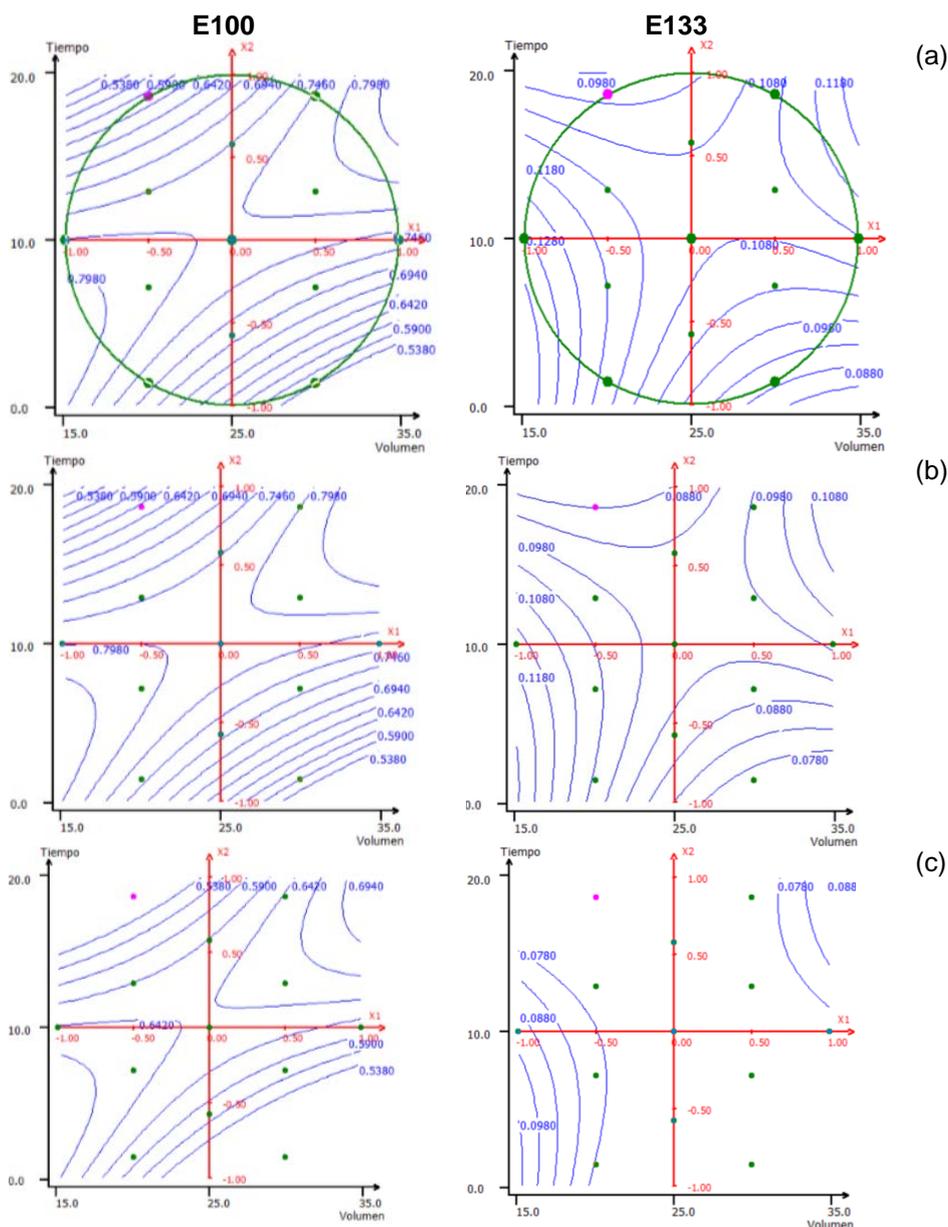


Figura 14. Curvas de nivel de los modelos ajustados para cada colorante fijando como dispositivo de agitación (a) ultrasonidos, (b) agitador magnético y (c) agitador vórtex.

Se definen las funciones de deseabilidad individual (d_i) para cada colorante (Figura 15). En el caso del E100, se consideran condiciones de extracción aceptables, es decir deseabilidad del 100%, aquellas que permitan extraer cantidades mayores de 0.78 mg, que supone 95% de la máxima cantidad extraída en el diseño experimental. Mientras que valores inferiores a 0.37 mg, equivalentes al 45% de la máxima cantidad extraída, no se consideran aceptables. Para el E133, se buscan las condiciones de extracción que permitan extraer cantidades de 0.12 mg, que equivale al 92% de la máxima cantidad extraída. Por otro lado, no son aceptables cantidades extraídas menores de 0.06 mg. Se ha dado el mismo peso a las dos respuestas en función de la deseabilidad global.

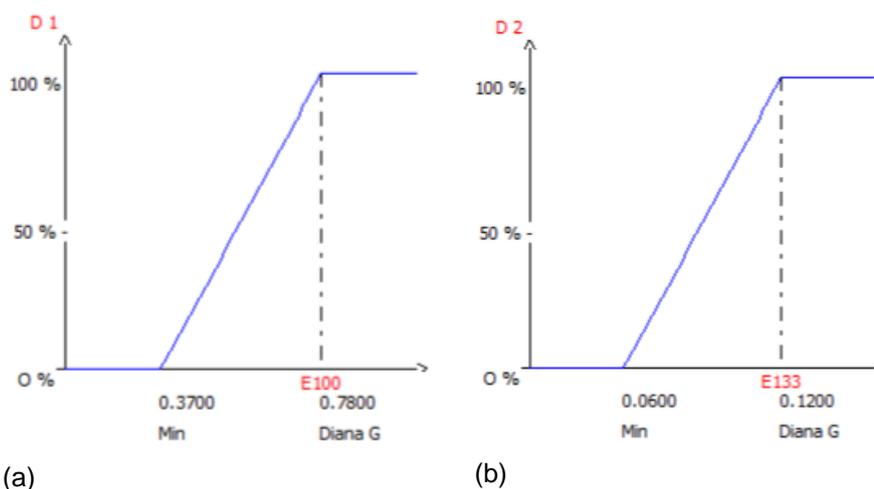


Figura 15. Funciones de deseabilidad individual para (a) E100 y (b) E133.

Las condiciones óptimas encontradas a través de la función de deseabilidad corresponden a una extracción mediante baño de ultrasonidos durante un periodo de extracción de 9.7 minutos y un volumen de la mezcla extractante de 16 mL (Figura 16).

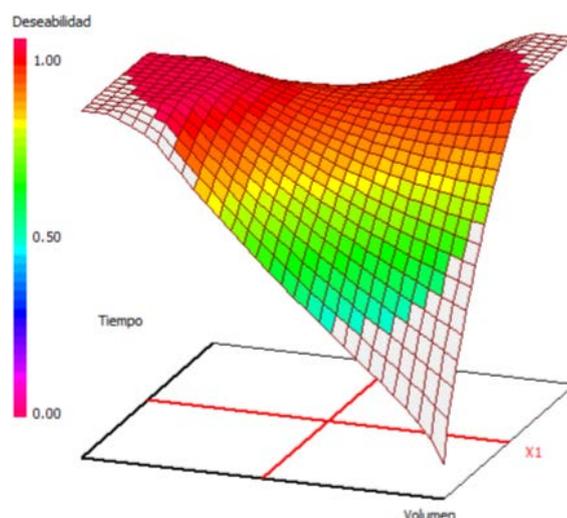


Figura 16. Superficie de la función de deseabilidad global fijando como dispositivo de agitación el baño de ultrasonidos.

El máximo alcanzado en la deseabilidad global (Tabla 8) define las condiciones de extracción óptimas de ambos colorantes y corresponde al 100% de la deseabilidad global. En este máximo, la deseabilidad individual para E100 y para el E133 es del 100%.

Tabla 8. Valores de la deseabilidad individual y global y cantidad de colorante extraído.

Respuestas	Nombre de la respuesta	Valor (mg)	di %
Y1	E100	0.7847	100.00
Y2	E133	0.1272	100.00
	Deseabilidad		100.00

6.3. Validación del procedimiento

La validación del método de determinación de los colorantes E100 y E133 puesto a punto se llevó a cabo a través de una serie de figuras de mérito como la exactitud (veracidad y precisión), la recuperación, el límite de decisión y la capacidad de detección.

La exactitud es el “grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado”. Para determinar la exactitud del método se debe determinar la veracidad, que se define como “grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado” y la precisión, que indica el “grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas)” [22].

Ambas figuras de mérito, veracidad y precisión, se evalúan a través de la recta de exactitud, en la que se representa la concentración predicha, con el método a validar, frente a la concentración real de cada colorante. La veracidad se suele expresar como sesgo, mientras que la precisión se expresa como imprecisión y se suele calcular como desviación estándar residual (s_{xy}) [22].

Para que un método sea veraz, la recta de exactitud debe cumplir dos condiciones, presentar una pendiente igual a 1 y una ordenada en el origen igual a 0. Esto se comprueba mediante tests de hipótesis, variando la hipótesis nula en cada test: H_0 : la pendiente es igual a 1 y H_0 : la ordenada en el origen es igual a 0. Como ya se ha comentado, la precisión se puede estimar mediante de la desviación típica residual (s_{xy}) de la recta de exactitud y se trata de una precisión intermedia.

En la recta de exactitud obtenida para cada colorante, los tests de hipótesis para el estudio de la pendiente y de la ordenada en el origen tienen un p-valor mayor que 0.05, por lo tanto, no hay suficientes evidencias para rechazar las hipótesis nulas a un nivel de confianza del 95%. Se establece, por tanto, que los métodos analíticos propuestos para la determinación de los colorantes E100 y E133 en cerezas verdes de cóctel son veraces. Mientras que la precisión intermedia del método analítico es 0.0059 mg L^{-1} para el colorante E100 y 0.0030 mg L^{-1} para el colorante E133 (Tabla 9), debido a que en ambos casos la s_{xy} es muy baja; se concluye que el método de determinación es preciso.

El límite de decisión ($CC\alpha$) es el “límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme” y la capacidad de detección ($CC\beta$) se define como el “contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de detección” [22]. En la Tabla 9 se muestran los valores del límite de decisión y la capacidad de detección para cada colorante. El límite de decisión estimado para el E100 es de 0.5602 mg L^{-1} , lo que supone 3.735 mg kg^{-1} de cerezas, mientras que el $CC\alpha$ para el E133 es de 0.016, lo que supone 0.107 mg kg^{-1} de cerezas. Por otro lado, la capacidad de detección para el E100 y E133 es 1.090 mg L^{-1} y 1.976 mg L^{-1} , lo que supone 7.266 mg kg^{-1} y $13.193 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 9. Rectas de exactitud y figuras de mérito obtenidas en la validación: decisión intermedia (s_{xy}), y límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$) en disolución y en cerezas de cóctel para los colorantes E100 y E133.

Colorante	E100	E133
Recta de exactitud	$C_{pred} = -0.00416 + 0.01366 \cdot C_{real}$	$C_{pred} = 0.00866 + 0.00718 \cdot C_{real}$
Coefficiente de correlación	0.9998	0.9982
Precisión intermedia (s_{xy})	0.0059	0.0030
$CC\alpha$ (mg L ⁻¹)	0.5602	0.0159
$CC\beta$ (mg L ⁻¹)	1.090	1.976
$CC\alpha$ (mg kg ⁻¹)	3.735	0.107
$CC\beta$ (mg kg ⁻¹)	7.266	13.193

La recuperación se define como “el porcentaje real de una sustancia recuperada durante el proceso analítico” [22]. Para evaluar la recuperación, se procedió a fortificar los 3 gramos de cerezas con una cantidad conocida de cada colorante, con el fin de que los colorantes penetren correctamente en la matriz de la muestra se deja en contacto durante un tiempo. Transcurrido ese tiempo se llevó a cabo la extracción con la mezcla extractante y las condiciones de extracción óptimas y se determinaron ambos colorantes en las muestras enriquecidas. La recuperación se estima, teniendo en cuenta las distintas concentraciones, mediante la Ecuación (5).

$$\% \text{ recuperación} = \frac{C. \text{ enriquecida} - C. \text{ real}}{C. \text{ añadida}} \quad (5)$$

La recuperación estimada para el colorante E100 es del 100%, ya que se recupera el total de la cantidad de colorante que se añade, mientras que el porcentaje de recuperación del E133 es del 70%.

6.4. Determinación de los colorantes E100 y E133 en muestras reales

La determinación de ambos colorantes en cerezas verdes de cóctel se realizó en las cerezas de una marca comercial en cuyo etiquetado se declara su uso como colorantes. Además, se trata de un producto novedoso en el mercado. El procedimiento de extracción se llevó a cabo en las condiciones óptimas anteriormente encontradas, y el análisis según se ha indicado en la sección Experimental.

Se calculó la cantidad de los colorantes E100 y E133 a través de una regresión univariante, y teniendo en cuenta la recuperación del proceso de extracción, se obtiene la concentración final del producto. La muestra de cerezas contenía 80 ± 5 mg de E100 por kg de cerezas y 23 ± 8 mg de E133 por kg de cerezas.

7. CONCLUSIONES

Con el estudio de la solubilidad de los colorantes E100 y E133 en distintos disolventes como agua, etanol, acetona y acetonitrilo, y los espectros correspondientes, se observó que el colorante E133 presenta un grupo cromóforo que absorbe en la región espectral del amarillo además de la banda de absorción del azul. En el caso del E100, no presenta señal espectral en la disolución acuosa debido a la escasa solubilidad en ese medio y, el máximo de la absorción del E100 en etanol se encuentra desplazado. Por ello, se realizaron mezclas binarias y ternarias en ausencia de agua como disolvente y considerando la restricción en la proporción de etanol hasta un 80% que

evita de esta forma el desplazamiento del espectro de absorción que dificultaría las comparaciones entre extracciones realizadas con las diferentes mezclas de disolventes. Se comprobó de esta forma la eficacia de las mezclas de disolventes en la extracción de estos dos colorantes.

La metodología de diseño de mezclas permite encontrar la mezcla óptima, capaz de extraer de forma simultánea y más eficaz ambos colorantes, que fue una mezcla ternaria formada por 80% de etanol, 10% de acetona y 10% acetonitrilo.

La metodología de superficie de respuesta y la función de deseabilidad permite obtener las condiciones de extracción óptimas en cuanto a tiempo de extracción, volumen de extractante y dispositivo de agitación, siendo éstas: 16 mL de la mezcla extractante y 9.7 minutos en un baño de ultrasonidos.

Con la validación del procedimiento analítico se concluye que el método es veraz, con precisiones intermedias de 0.0056 mg L^{-1} y 0.003 mg L^{-1} para E100 y E133, respectivamente. Los valores de $CC\alpha$ y $CC\beta$ alcanzados fueron 0.5602 mg L^{-1} y 1.090 mg L^{-1} para E100, mientras que para E133 fueron 1.0157 mg L^{-1} y 1.976 mg L^{-1} (para $\alpha=\beta=0.05$ en todos los casos).

La metodología de extracción aplicada permite una extracción del 100% del colorante E100 y una extracción del 70% del colorante E133 en el producto. Los valores de concentración obtenidos, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación, para E100 y E133 son 80 mg de E100 por kg de cerezas y 23 mg de E133 por kg de cerezas. Los valores de concentración encontrados para ambos colorantes cumplen la legislación comunitaria (UE), ya que para las cerezas de cóctel no hay límite máximo para el colorante E100, mientras que para el E133 el límite máximo de concentración en conservas de frutos rojos es 200 mg kg^{-1} .

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios. DOUE 354 del 31/12/2008.
- [2] Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994 relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios. DOUE-L-1994-81394.
- [3] Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión por el que se modifica el anexo II del Reglamento (UE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. DOUE 295 del 12/11/2011, 1-177.
- [4] R.J. Sánchez (2013). La química del color en los alimentos. Química Viva, 12 nº 3, 234-246.
- [5] P. Amchova, H. Kotolova and J. Ruda-Kucerova (2015). Health safety issues of synthetic food colorants, Regulatory Toxicology and Pharmacology 73, 914-922.
- [6] U. Wissgott (1984). Procedimiento para colorear artificialmente la fruta. Patente nº 528635. Registro de la propiedad industrial, España.
- [7] M. Maldonado, M. Zanon, M. Almanza, M. Barroso, G. Polenta, G. Denoya and C. Sanow (2006). Uso del colorante Azul Brillante en cerezas en conserva, Revista Española de Nutrición Comunitaria, 2, 38-48.
- [8] M. González, M. Gallego and M. Valcárcel (2003). Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic

solid-phase extraction system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2121-2129.

[9] W. Wichitnithad, N. Jongaroonngamsang, S. Pummangura and P. Rojsitthisak (2009). A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts, *Phytochemical Analysis*, 20, 314–319.

[10] M. Hajimahmoodi, M. Afsharimanesh, G. Moghaddam, N. Sadeghi, M.R. Oveisi, B. Jannat, E. Pirhadi, F.Z. Mazdeh and H. Kanan (2013). Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography, *Food Additives & Cotaminants: Part a*, 30 n° 5, 780–785.

[11] A. Bordagaray, R. Garcia-Arrona, M. Vidal and M. Ostra (2018). Determination of food colorants in a wide variety of food matrices by microemulsion electrokinetic capillary chromatography. Considerations on the found concentrations and regulated consumption limits, *Food Chemistry*, 262, 129-133.

[12] J. Yi, L. Zeng, Q. Wu, L. Yang and T. Xie (2018). Sensitive simultaneous determination of synthetic food colorants in preserved fruit samples by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Food Analytical Methods*, 11, 1608-1618.

[13] M.J. Llerena (1995). Nuevos métodos fotométricos y electroquímicos de determinación de colorantes amarillos en alimentos. Cuenca: Universidad de Castilla-La Mancha.

[14] L.A. Sarabia and M.C. Ortiz (2009). Response Surface Methodology. En *COMPREHENSIVE CHEMOMETRICS Chemical and Biochemical Data Analysis* (pp. 391-449). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V.

[15] D.E. Palomera (2018). Desarrollo de un sistema automático para la extracción y pre-concentración de I¹³¹ en muestras biológicas y residuos hospitalarios. (Tesis doctoral). Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Universidad de Islas Baleares.

[16] A.R de Sena, G.L. Valasques, I.K. São Paulo Barretto and S.A. Assis (2012). Aplicación del diseño experimental de Doehlert en la optimización de variables experimentales para *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) y *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) lisis celular, *Cienc. Tecnol. Alimento*, 32 n° 4.

[17] D. Voinovich, R. Phan-Tan-Luu and B. Campis (2009). Experimental Design for Mixture Studies. En *COMPREHENSIVE CHEMOMETRICS Chemical and Biochemical Data Analysis* (pp. 391-449). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V.

[18] G. Derringer and R. Suich (1980). Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.

[19] D. Mathieu, J. Nony and R. Phan-Tan-Luu, (2007). NemrodW (Versión 2007_03), L.P.R.A.I, Marsella.

[20] Statgraphics Centurion XVII (2014). StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA.

[21] L. Sarabia and M.C. Ortiz, (1994). DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13, 1-6.

[22] Decisión de la Comisión, n° 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial* n° L 221 de 17/08/2002 8-36.