

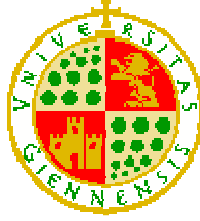
UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Determinación de colorantes alimentarios sintéticos en alimentos mediante HPLC/MS

Alumno: Roberto Mena Aranda

Julio, 2019



Universidad de Jaén
Facultad de Ciencias Experimentales

DETERMINACIÓN DE COLORANTES ALIMENTARIOS SINTÉTICOS EN ALIMENTOS MEDIANTE HPLC/MS

Fdo. Roberto Mena Aranda

Jaén, Julio de 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Seguridad Alimentaria	2
2.2. Aditivos alimentarios	3
2.2.1. Aspectos legales.....	4
2.3. Colorantes alimentarios.....	5
2.3.1. Química del color	5
2.3.2. Aplicaciones de colorantes	5
2.4. Colorantes naturales	6
2.5. Colorantes sintéticos	9
2.6. Seguridad Alimentaria y consideraciones toxicológicas	14
2.6.1. Hiperactividad e hipersensibilidad.....	14
2.7. Legislación	15
2.8. Métodos de análisis.....	16
2.8.1. Aspectos de calidad.....	16
2.8.2. Aspectos de seguridad	16
2.8.3. Técnicas de preparación de muestras	17
2.8.4. Técnicas de determinación de colorantes sintéticos.....	20
3.- OBJETIVOS	24
4.- EXPERIMENTAL.....	24
4.1.- Materiales y reactivos	24
4.2.- Tratamiento de muestra	25
4.2.1. Tratamiento previo de homogeneización y disolución	25
4.2.2. Etapa de purificación con SPE.....	25
4.3.- Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (HPLC-TOFMS).....	27
5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
5.1.- Método aplicado.....	29
5.2.- Parámetros analíticos	32
5.3.- Aplicación a muestras reales	34
6.- CONCLUSIONES.....	41
7.- BIBLIOGRAFÍA	43

1. RESUMEN

En este trabajo, se ha empleado un método de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (HPLC-TOFMS) con el fin de determinar colorantes sintéticos en alimentos de interés. El estudio se ha centrado en aquellos cuyo uso es controvertido o incluso están prohibidos, como son Amarillo de quinoleína (monosulfónico y disulfónico), Amarillo Anaranjado, Tartracina, Carmoisina, Ácido Carmínico, Rojo Allura AC, Azul Brillante FCF y Sudán (I-IV). Dependiendo del estado de agregación de la muestra se emplearon diferentes tratamientos de muestra incluyendo desgasificado, disolución y extracción en fase sólida, esta última común a todas ellas como etapa de purificación. La determinación se llevó a cabo mediante HPLC-TOFMS con ionización por electrospray, tanto en modo positivo como negativo. El método incluyó un total de 12 colorantes sintéticos y fue aplicado a un total de 20 muestras incluyendo golosinas líquidas y semisólidas, bebidas gaseosas y gelatinas.

ABSTRACT

In this work, a method of liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOFMS) was applied to determine synthetic dyes in foostuffs. The study covered both controversial and banned dyes such as Quinoline Yellow (monosulfonic and disulfonic), Sunset Yellow FCF, Tartrazine, Carmoisine, Carminic Acid, Allura Red AC, Brilliant Blue FCF and Sudan (I-IV). Depending on the sample, a treatment based on degassing or dilution/dissolution was followed by a solid phase extraction cleanup. The determination was carried out using HPLC-TOFMS using electrospray in both negative and positive ion mode. The method covered up to 12 different dyes and was applied to 20 samples including liquid and semisolid candies, soft drinks and jellies, where some of the targeted analytes were detected.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Seguridad Alimentaria

La Seguridad Alimentaria es un aspecto preocupante hoy en día en la sociedad. Las distintas organizaciones tratan de concienciar a la sociedad de la importancia de conocer los alimentos que se compran y se toman, además de que éstos sean inocuos, es decir, que deben estar libres de contaminantes químicos, microorganismos u otros compuestos que puedan causar algún riesgo para la salud (Castilla Fernández, 2017). La presencia de sustancias ajenas al alimento que puedan haber sido incorporadas a él, pueden conllevar dicho riesgo. La palabra contaminante hace referencia a *cualquier sustancia que no haya sido agregada intencionadamente al alimento en cuestión, pero que se encuentra en el mismo como residuo de la producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como consecuencia de la contaminación medioambiental.*

Los aditivos alimentarios son un tipo de sustancias añadidas intencionadamente a los alimentos con un interés tecnológico y que forman parte de él como ingredientes. Pese a que no se incluyen dentro de la propia definición de contaminante, sí que pueden comportarse como compuestos tóxicos si la cantidad empleada es superior a la permitida. (Pérez Ortega, 2015)

A nivel europeo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se encarga de la evaluación científica, objetiva e independiente de los riesgos relacionados con los alimentos.

A nivel estatal, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) es la que se encarga de la creación de Planes Nacionales específicos de Control Oficial o con una Red de Alerta Alimentaria. (Castilla Fernández, 2017)

A nivel comunitario, la legislación alimentaria tiene como objetivo garantizar la libre circulación de alimentos y piensos en la Unión Europea (EU, *European Union*), adaptándolo según las normas internacionales.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es un organismo autónomo que promueve la salud de los ciudadanos para que tengan la confianza en los alimentos que consumen, así como información adecuada. Para conseguir

elevados niveles de seguridad alimentaria en la Unión Europea, la Comisión Europea expuso en el “*Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*” las distintas estrategias para conseguir los más elevados niveles de seguridad alimentaria en la EU, pues establece el “Análisis de riesgo”, como base de la política de la seguridad alimentaria, a través del Reglamento 178/2002, incluyendo:

- Evaluación del riesgo: asesoramiento científico y análisis de datos.
- Gestión del riesgo: pondera las distintas opciones normativas según los resultados de la evaluación del riesgo y si es necesario adoptar las medidas apropiadas para prevenir, reducir o eliminar el riesgo.
- Comunicación del riesgo: proporciona información apropiada, coherente y exacta sobre seguridad agroalimentaria a todos los interesados según la conclusión científica obtenida. (Esteo Donaire, 2018)

2.2. Aditivos alimentarios

La puesta en mercado de un alimento sugiere un aprobado de los cinco parámetros prioritarios: color, sabor, textura, valor nutritivo y seguridad, aunque también de otros aspectos prácticos como su coste, preparación, etc. Es por ello, que en muchas de las ocasiones, deben añadirse ciertos compuestos a los alimentos para que adquieran dichos atributos.

Un aditivo es una sustancia, o mezcla de varias sustancias, que se adiciona durante o posteriormente a la producción, además de en su consumición para mejorar los alimentos. Éste no se consume normalmente como alimento, ni tampoco es un ingrediente básico en los alimentos, sino que su adición afecta a las características del producto, además de las propiedades sensoriales. Jamás son utilizados para enmascarar materias primas o productos de mala calidad.

Organizaciones como *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos, la Unión Europea y el *Codex Alimentarius*, junto con *Food and Agriculture Organization de la ONU* (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS), exponen los usos, toxicidades, incluso recomendaciones acerca de los aditivos, estableciendo así una Ingesta Diaria Admisible (IDA) en relación al peso corporal sin que suponga un riesgo para la salud.

Los edulcorantes de mesa, sal común, vinagre, al añadirse sobre alimentos, también se pueden considerar como aditivos. Desde hace muchos siglos todos estos aditivos se emplean para mejorar estabilidad, los parámetros sensoriales y/o nutritivos de los alimentos. Debido a que no causan daños en la salud, no está restringido su empleo y la limitación es propia del consumidor. Sin embargo, aditivos como tartrazina, glutamato monosódico, con capacidad de provocar alergias, deben ser identificados claramente en el etiquetado de los alimentos.

Los aditivos que se añaden para la conservación de los alimentos son conservantes, antioxidantes, agentes reductores, y para mejorar las propiedades organolépticas se añaden saborizantes, colorantes, edulcorantes, espumantes, emulsionantes, entre otros. Otros aditivos poseen ambas funciones, como los polioles (edulcorante, reducen la actividad del agua), por ejemplo. (Badui Dergal, 2013)

En este trabajo se abordarán los colorantes sintéticos como aditivos, su determinación y caracterización.

2.2.1. Aspectos legales

Los aditivos no pueden usarse en caso de:

- Ocultar defectos de calidad.
- Enmascarar adulteraciones.
- Ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte.
- Reemplazar ingredientes en los productos que supongan un engaño de la verdadera composición de los mismos.
- Alterar los resultados analíticos de los productos que se añaden.

Los aditivos se comercializan en forma de polvos, soluciones, emulsiones, nanopartículas, etc.

2.3. Colorantes alimentarios

Los colorantes son utilizados en la industria para proporcionar un color atractivo a algunos alimentos preparados o para restituir el color perdido en los procesos de elaboración de los mismos. Tiene mayor uso en bebidas, dulces, helados, caramelos, etc. (Primo Yúfera, 1998)

2.3.1. Química del color

El color es considerado uno de los atributos más delicados de los alimentos, el cual influye directamente la preferencia y selección de los consumidores. (Delgado *et al.*, 2003). Las propiedades que poseen los colorantes son las siguientes: la luz blanca interacciona con la materia y es descompuesta en sus distintas longitudes de onda, o cualquier color distinto al blanco es emitido por alguna fuente. Esto significa que se produce una transición electrónica entre orbitales moleculares con diferentes niveles energéticos, los cuales son responsables del color asociados a los compuestos orgánicos, ya sean de origen natural o sintético. Es decir, posee sistemas π con dobles enlaces conjugados que produce una deslocalización de los electrones. La presencia de grupos electrón donante-aceptor en la molécula proporciona la absorbancia de luz de baja energía, largas longitudes de onda, en el espectro visible (400-750 nm) (Larry *et al.*, 2002).

2.3.2. Aplicaciones de colorantes

- Corregir las variaciones del color en comidas e ingredientes.
- Corregir cambios de colores durante el proceso, empaquetado, distribución de algunos alimentos.
- Enfatizar el sabor asociado o preservar las características únicas de identificación. (Larry *et al.*, 2002)

Los colorantes son usados para colorear una amplia variedad de productos como cuero, ropa, comida, juguetes, plásticos y cosméticos. (Ahlström *et al.*, 2005)

2.4. Colorantes naturales

Entre las características principales de los colorantes naturales, se encuentran las siguientes:

- Deben existir en la naturaleza.
- Deben ser extraídos mediante procedimientos mecánicos.
- El material crudo debe ser natural.

Las fuentes principales de obtención de estos colorantes son plantas, extractos de plantas, a veces provienen de animales como insectos, algas, hongos y bacterias. En el caso de los colorantes inorgánicos, éstos provienen de minerales, como el ocre.

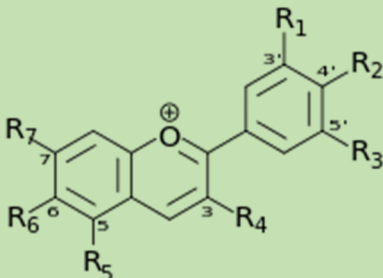
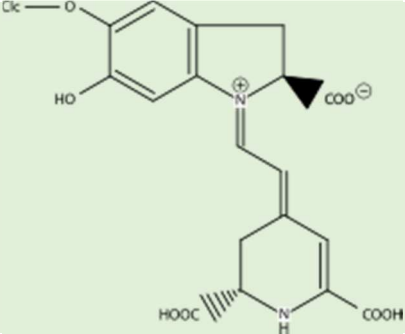
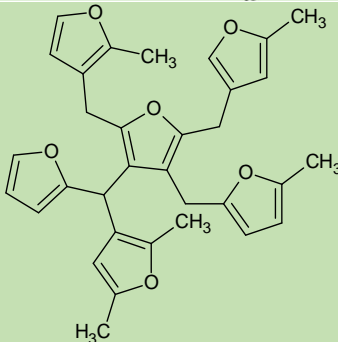
El análisis de estos compuestos es importante debido a que se pueden formar compuestos tóxicos mientras se producen los colorantes como el color caramelo, realización de fraudes sobre ellos, etc.

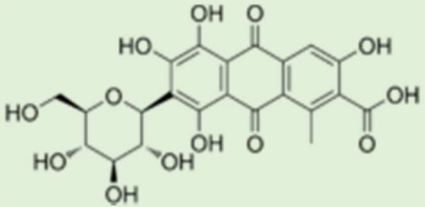
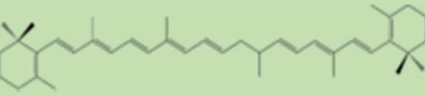
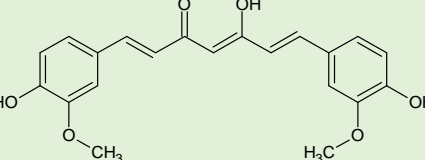
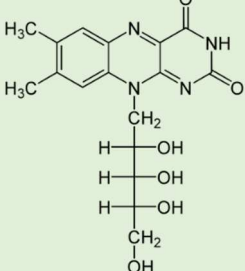
Los colorantes naturales también están regulados, como antocianinas, betalaínas, color caramelo, ácido carmínico, carotenoides, clorofilas y derivados, curcumina y riboflavina. Dependiendo de su producción, propiedades y uso de diferentes extractos con diferentes propiedades colorantes son clasificados en distintos grupos.

En el caso de las antocianinas, son un alto potencial como colorante natural alimentario que cada vez sustituye más a los colorantes sintéticos alimentarios, pues cada vez se buscan más plantas con estos compuestos, así también con aquellos que tengan mayor estabilidad. (Wrolstad *et al.*, 2012)

En la **Tabla 1** se muestran los distintos colorantes naturales, su correspondiente código E, estructura química y una breve descripción de los mismos.

Tabla 1. Código, estructura química y descripción de los distintos colorantes naturales.

Colorante	Código	Estructura química	Descripción
Antocianinas	E-163		<p>Proviene de la familia de los flavonoides, solubles en agua, presentes en plantas vasculares, mostrando el color en todas las partes de la planta para su propia protección ante patógenos. Su color varía con el pH, siendo rojo en medio ácido y morado en medio neutro.</p>
Betalainas	E-162		<p>Proviene de algunos hongos y plantas de la familia de <i>Caryophyllales</i>, solubles en agua. Su color proporciona señales que atraen a los animales a la polinización y disseminación. Más estables que las antocianinas, presentan un color rojo en medio acuoso o por acción del calor o luz. Presenta propiedades antioxidantes, usados como aditivos en drogas y cosméticos.</p>
Caramelo	E-150		<p>Más del 80% de los componentes alimentarios, clasificados como a, b, c y d. Se dividen según compuestos amoniacos, sulfitos o ambos.</p>

<p>Ácido carmínico</p>	<p>E-120</p>		<p>Proviene de determinados insectos como <i>Kermes</i>, <i>Cochinilla Polaca</i>, <i>Armenia</i>, etc. Son derivados de antraceno, denominadas antraquinonas. Inestables a cambios de temperatura e iluminación, variando también su color en función del pH, siendo naranja en medio ácido, rojo en medio neutro y violeta en medio básico.</p>
<p>Carotenoides</p>	<p>E-160, E-161</p>		<p>Esqueleto tetraterpénico simétrico (C40), cuyos grupos finales son modificados con anillos dicíclicos. La presencia de grupos funcionales oxigenados, pueden ser carotenos o xantofilas. Juegan un papel importante en la fotosíntesis como pigmentos fotoprotectores y recolectores de luz.</p>
<p>Curcumina</p>	<p>E-100</p>		<p>Es un extracto crudo que contiene distintos pigmentos amarillos. Varía el color en función del pH, siendo amarilla en el intervalo 1-7 y roja fuera de este intervalo.</p>
<p>Melaninas</p>	<p>---</p>	<p>---</p>	<p>Son pigmentos oscuros procedentes de bacterias, hongos, animales y plantas. Se usa en pasta, risotto y algunas salsas.</p>
<p>Riboflavinas</p>	<p>E-101</p>		<p>Es un colorante amarillo procedente de hongos. Es sensible a la luz y susceptible a la oxidación. (Solymosi <i>et al.</i>, 2015)</p>

2.5. Colorantes sintéticos

Los colorantes sintéticos son obtenidos a partir de la modificación química de compuestos precursores de fuentes naturales. Los tintes azoicos son colorantes sintéticos producidos, permitidos para producirse en alta pureza, calidad constante y en gran cantidad, apenas tienen sabor y proporcionan una alta intensidad de color.

Estos colorantes azoicos presentan un grupo azo ($-N\equiv N-$) en su estructura química, casi siempre unido a dos anillos aromáticos. Según el número de grupos “azo” en la estructura molecular, pueden ser clasificados como mono-, di-, tri-, tetra- y poli-azo. Debido a la presencia de electrones π a través de los dos anillos aromáticos y el grupo “azo”, existe un sistema conjugado que hace que el compuesto absorba en la región del visible, proporcionando así un color al compuesto.

La autorización de estos compuestos está regulada por el reglamento de la Comisión Europea No. 1333/2008 (**Tabla 2**). Los colorantes más utilizados son el amarillo y el rojo, siendo menor el uso del azul y marrón. Según la Autoridad Europea de la Seguridad Alimentaria (EFSA), aproximadamente, el 70% de los colorantes utilizados que han sido producidos son de tipo azoico. (Larry *et al.*, 2002)

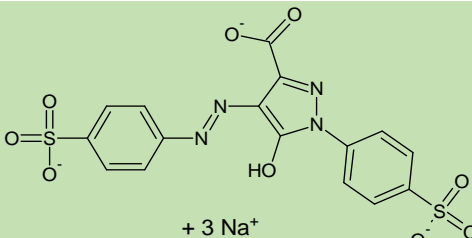
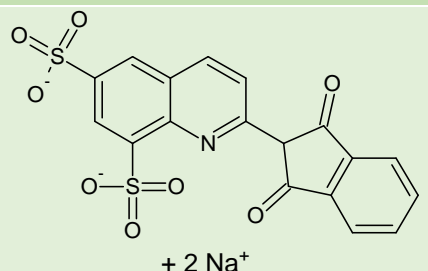
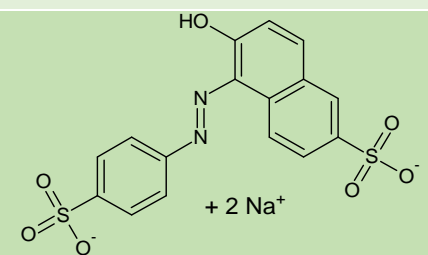
Los colorantes azo son relativamente resistentes a la degradación bajo condiciones aeróbicas, pueden ser reducibles a la forma de aminas aromáticas bajo condiciones anaeróbicas. La reducción primaria ocurre a través de la división de los grupos azo por azoreductasas presentes en las bacterias intestinales, microflora en la superficie de la piel, etc. La principal exposición de los consumidores a los colorantes azo y sus productos de degradación son vía oral (niños que chupan juguetes que contienen tintes textiles o cuero) y por absorción cutánea. (Ahlström *et al.*, 2005)

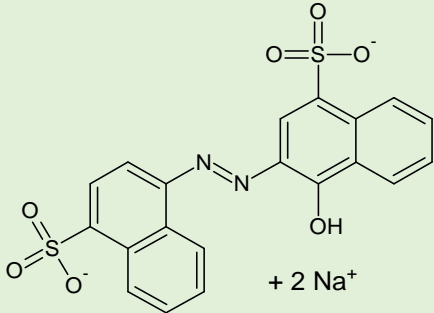
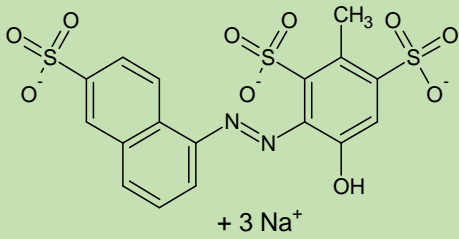
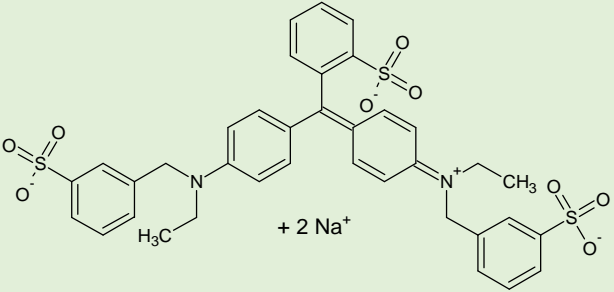
Tabla 2. Colorantes alimentarios sintéticos autorizados en la Unión Europea (UE) de acuerdo a la Regulación de la Comisión Europea (EC) No. 1333/2008.

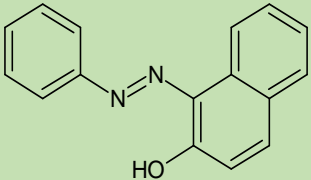
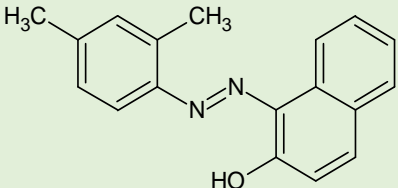
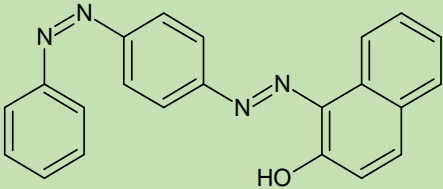
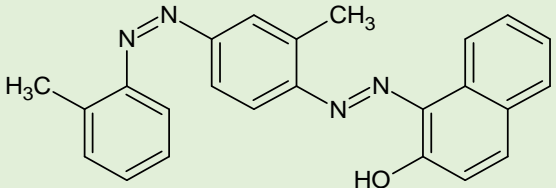
Colorantes sintéticos alimentarios	
Número E	Nombre
E-102	Tartracina
E-104	Amarillo de quinoleína
E-110	Amarillo anaranjado
E-122	Carmoisina, Azorubina
E-123	Amaranto
E-124	Ponceau 4R, Rojo Cochinilla A
E-127	Eritrosina
E-129	Rojo Allura AC
E-131	Azul Patente V
E-133	Azul Brillante FCF
E-142	Verde S
E-151	Negro Brillante BN, Negro PN
E-154	Marrón FK
E-155	Marrón HT
E-160e	β -Apo-8'-carotenal (C 30)
E-180	Litolrubina BK

En la **Tabla 3** se muestran los distintos colorantes sintéticos estudiados en este trabajo, con su correspondiente descripción, estructura química y código E para cada uno de ellos.

Tabla 3. Descripción de colorantes sintéticos, su correspondiente código E y estructura química.

Colorante	Código	Estructura química	Descripción
Tartracina	E-102		Es un colorante monoazoico, de color amarillo, soluble en agua, usado como sales de sodio, potasio, calcio y aluminio. Estable a altas condiciones de temperatura y medios ácidos. Concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es de 50 hasta 500 mg/kg. En bebidas alcohólicas es 100 mg/L el máximo permitido. Datos de la IDA: 7,5 mg/kg de peso corporal.
Amarillo de quinoleína	E-104		Es un colorante de quinofalona, con una mezcla de ácidos mono, di y trisulfónico, siendo este último el más abundante. Es soluble en agua. Concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es de 50 hasta 500 mg/kg. En bebidas alcohólicas es 100 mg/L el máximo permitido. Datos de la IDA: 0,5 mg/kg de peso corporal.
Amarillo anaranjado	E-110		Es un colorante azoico de color amarillo, estable como sal de sodio y potasio, por lo que es soluble en agua. Concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es de 50 hasta 500 mg/kg. En bebidas alcohólicas es 50 mg/L el máximo permitido. Datos de la IDA: 1 mg/kg de peso corporal.

<p>Carmoisina</p>	<p>E-122</p>		<p>Es un colorante azoico rojo, soluble en agua. Concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es de 50 hasta 500 mg/kg. En bebidas alcohólicas es 50 mg/L el máximo permitido. Datos de la IDA: 4 mg/kg de peso corporal.</p>
<p>Rojo Allura AC</p>	<p>E-129</p>		<p>Es un colorante azoico rojo, soluble en agua, inestable en presencia de agentes reductores y oxidantes como azúcares, ácidos y sales, variando también sus propiedades dependiendo de la cantidad de insaturaciones conjugadas en la molécula. Concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es de 25 hasta 500 mg/kg. En bebidas alcohólicas es 100 mg/L el máximo permitido. Datos de la IDA: 7 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2009)</p>
<p>Azul Brillante FCF</p>	<p>E-133</p>		<p>Es un colorante triarilmetano soluble en agua, excretado por medio de heces. Concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es de 20 hasta 500 mg/kg. En bebidas alcohólicas es 100 mg/L el máximo permitido. Datos de la IDA: 6 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2010)</p>

Sudán I			<p>Son colorantes mono y diazoicos amarillos. Presentan propiedades genotóxicas (daños al material genético por medio de agentes físicos químicos o biológicos), y algunos de ellos son cancerígenos, como el sudán I. (EFSA, 2005)</p>
Sudán II	---		
Sudán III			
Sudán IV			

2.6. Seguridad Alimentaria y consideraciones toxicológicas

Para determinar si un colorante es tolerado para su consumo, es campo de trabajo de la FDA, la cual introdujo un nivel de ingesta diaria aceptado (IDA).

2.6.1. Hiperactividad e hipersensibilidad

La tartrazina ha sido uno de los compuestos más estudiados, pues ha provocado algunos casos de intolerancia y broncoespasmo en asmáticos. Se ha observado que la ingesta de ciertos colorantes promueve hiperactividad en los niños. (Larry *et al.*, 2002). Un déficit de atención e hiperactividad es lo más común en los niños, tales como tartracina, amarillo de quinoleína, amarillo anaranjado, carmoisina/azorubina, ponceau 4R, rojo allura AC. (Martins *et al.*, 2016)

En el artículo 3 de la Regulación de la Comisión Europea No. 1333/2008 expone:

“Un aditivo alimentario significa cualquier sustancia que no se consume como alimento por sí mismo ni tampoco posee las características de un ingrediente de comida, tenga o no valor nutritivo, se adiciona en la comida en procesos tecnológicos de producción, proceso, preparación, empaquetamiento, transporte y almacenamiento, llegando a ser un componente directamente o indirectamente en la comida”.

Consiste en prescribir una lista de colorantes permitidos, incluyendo aquellos cuya aplicación es restrictiva con valores máximos permitidos. Los aditivos alimentarios, adecuadamente identificados, deben estar acompañados de su origen, descripción de procesos de producción y se debe establecer un criterio de pureza aceptado para cada aditivo, incluyendo límites máximos de impurezas indeseados.

La EFSA es representada por la Comisión Europea (EC) para asesorar y comunicar de todos los riesgos asociados con la cadena alimentaria, incluyendo aditivos alimentarios. Propusieron la ingesta diaria admisible, es decir, la cantidad de aditivo que puede ser consumido sin crear riesgo en la salud, y está expresado en relación al peso corporal con el fin de permitirlo para distintos tamaños de cuerpo, como en niños de diferentes edades. La Junta FAO/WHO y el Comité Experto en Aditivos Alimentarios (JECFA) actúan con un papel similar vital, proporcionando una fuente de aviso experto de forma internacional contribuyendo a la difusión estándar a una escala global. Para poder ser catalogados como permitidos deben pasar un test de toxicidad a priori por la industria alimentaria. Además FAO/WHO crearon el *Codex Alimentarius*,

compuesto de autoridades, asociaciones de industrias alimentarias y grupo de consumidores con el fin de regular el uso de los aditivos. Es por ello que la categoría de los aditivos se clasifica con su nombre completo y se añade E y un número. (Scotter, 2015)

El uso de algunos colorantes alimentarios sintéticos es controvertido debido a diferentes estudios que sugieren su alto potencial cancerígeno y genotóxico, pudiendo producir respuestas alérgicas y otras manifestaciones de intolerancias, particularmente en los niños. Estos colorantes son Tartracina, Amarillo de quinoleína, Amarillo anaranjado, Carmoisina, Ponceau 4R y Rojo Allura AC, siendo aún permitidos por el FDA y muy utilizados en comida y refrescos. (Coultrate *et al.*, 2018)

2.7. Legislación

En la **Tabla 4**, se muestra un resumen de la legislación europea para los aditivos alimentarios:

Tabla 4. Legislación europea sobre aditivos alimentarios.

Normativa	Descripción
Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.	Información acerca de los aditivos, nombramiento, definición, forma de etiquetado, usos.
Reglamento (CE) N° 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.	Establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios.
Reglamento (UE) N° 231/2012 de la Comisión.	Establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.
Reglamento (UE) N° 257/2010 de la Comisión.	Establece un programa para la reevaluación de aditivos alimentarios autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios.

2.8. Métodos de análisis

Los pigmentos son generalmente colorantes alimentarios insolubles en agua que requieren de algunas formas de dispersión que afectan a sus propiedades coloreadas en sistemas acuosos. El mayor porcentaje de componentes de colorantes sintéticos solubles en agua son colorantes activos y sales inorgánicas. Entre los distintos parámetros que desestabilizan los colorantes se incluyen: temperatura, luz, aire/oxígeno, pH, estructura química, disolventes, almacenamientos, etc.

La elección del método de análisis no solo depende de si es un colorante artificial o natural, sino también de su método de producción y sus características físico-químicas. (Jiménez *et al.*, 2014)

2.8.1. Aspectos de calidad

Conlleva la determinación de propiedades como la forma, tonalidad, pureza, y está ligado a su contenido y a la solubilidad en los distintos solventes. También incluye una caracterización microbiológica como calentamiento, luz y condiciones ácido/base.

2.8.2. Aspectos de seguridad

El criterio de pureza incluye impurezas derivadas de la producción tanto como los materiales primarios, metales pesados, compuestos intermediarios, precursores y productos de reacciones secundarias produciéndose así varias etapas sintéticas con transformaciones de oxidación, reducción, sulfonación, etc.

Para colorantes naturales son reconocidas sus fuentes, cuyo criterio de pureza incluye un porcentaje total de materia coloreada, los componentes principales de color como isómeros y un conocimiento de los procesos de artefactos y contaminantes.

Los colorantes más utilizados son aquellos que propician los colores azul, rojo, naranja, amarillo, verde y blanco, pero también son los más estudiados en términos de seguridad, efectos adversos, toxicidad a corto, medio y largo plazo, además del impacto sobre la salud. Según la IDA, el azul, amarillo, verde y blanco son colorantes menos peligrosos, incluso en altas dosis; sin embargo, del rojo al naranja, colorantes como eritrosina y amaranto presentan efectos adversos y toxicidad, los cuales están

presentes en bebidas alcohólicas, pescado, carne y golosinas entre otros. (Gostner et al., 2015)

2.8.3. Técnicas de preparación de muestras

El aislamiento de estos colorantes sintéticos de comidas y bebidas a menudo requiere extracciones seguidas de purificaciones con el fin de eliminar todas aquellas impurezas y concentrar para identificar y cuantificar dichos compuestos. Para muestras sólidas se requiere filtración o centrifugación para eliminar partículas suspendidas; los sólidos, sin embargo, requieren de una maceración con un disolvente. Algunos colorantes presentan una fuerte unión con la matriz de los alimentos que deben ser eliminadas por medio de digestión de enzimas como celulasa, lipasa, etc. En el pretratamiento deben molerse o cortarse las muestras en pequeñas piezas para incrementar el área de superficie de la muestra para así optimizar la etapa de extracción.

Los colorantes azoicos son liposolubles, pero también pueden disolverse en agua y en algunos disolventes orgánicos, por ello, pueden seguirse las distintas técnicas de extracción mostradas en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Técnicas de preparación de muestra para la extracción de colorantes sintéticos.

Técnica	Descripción
Extracción en fase sólida (SPE)	<p>Es usado para aislar analitos y purificar extracciones donde interfieren componentes que serán eliminados para poder identificar el analito en fase reversa (C18). Las etapas son:</p> <ul style="list-style-type: none">- Etapa acondicionadora: para eliminar aire del cartucho o activar los ligandos de la superficie.- Etapa de carga de muestra- Etapa de lavado: elimina los contaminantes que no se quieren analizar.- Etapa de elución: se disuelven los analitos a analizar en un disolvente que pasa a través de la columna. <p>Las muestras se llevan a un pH de 2, utilizando como disolvente una mezcla de amonio-metanol. También destacan microextracciones en fase sólida dispersiva, usando nanopartículas de sílica diamino funcionalizado, variando los pH o incluso poliamida.</p>
Extracción líquido-líquido (LLE)	<p>La extracción líquido-líquido se basa en un método con altos modificadores selectivos como pH, sales, pares iónicos, etc. Dos líquidos inmiscibles hacen que los componentes de la muestra se disuelvan en cada uno en función de su polaridad, ya que usualmente se utilizan disolventes polares y apolares. Casi siempre está basado en acetonitrilo ya que solubiliza las grasas, precipitados de proteínas y carbohidratos.</p>
Extracción con ultrasonidos asistidos (UAE)	<p>La extracción con ultrasonidos asistidos es un método muy simple, utiliza poco disolvente orgánico lo que ayuda a reducir en costes y facilita su disposición. Se utilizan dos fases de metanol y acetona, haciendo posible la extracción de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos. Los ultrasonidos favorecen la ruptura de las matrices de los alimentos. No se utilizan en aquellas muestras que contengan altas cantidades en grasas.</p>

Extracción en punto nublado (CPE)	<p>La extracción de punto nublado está basado en la separación de fases en función de su comportamiento de surfactantes, las cuales forman micelas. Hay un cambio de presión o temperatura o adición de un nuevo aditivo. Es decir, de una solución origina dos fases líquidas. Se usa para muestras como refrescos, dulces o gelatina de naranja. (Rovina <i>et al.</i>, 2017)</p>
Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	<p>Usando CO₂, como medio de extracción polar que no deja residuo de disolvente.</p>
Extracción mediante par iónico	<p>A menudo la extracción de colorantes requiere una extracción mediante par iónico en medio acuoso seguido de la extracción con un disolvente orgánico y luego limpiar usando una columna cromatográfica o una SPE. (Scotter, 2015)</p>
Cromatografía de gel permeable (CPG)	<p>La utilización de este gel implica un limpiador para multiresiduos de multimatrices, es decir, sirve para eliminar moléculas interferentes, basado en la diferencia entre el tamaño molecular y los compuestos objetivo. Se encarga de eliminar pigmentos parciales y moléculas interferentes, pues son compuestos de gran tamaño, que pueden ser eluidos rápidamente más que los compuestos de pequeño tamaño, además evita el deterioro de la columna cromatográfica. (Sun <i>et al.</i>, 2007)</p>

2.8.4. Técnicas de determinación de colorantes sintéticos

Para la determinación de colorantes puros, en la **Tabla 6** puede observarse los principales métodos utilizados para la determinación de colorantes sintéticos en alimentos.

No obstante, para la determinación de colorantes en algunas de las muestras de comida, tales como refrescos, gelatinas, golosinas, el procedimiento a seguir para el tratamiento de la muestra y la determinación de los colorantes sintéticos de la misma, vienen citados en la **Tabla 7**.

Para el análisis de trazas de colorantes, pueden ser determinados mediante gravimetría, procedimientos electroquímicos, cromatografía de cambio iónico, usando el HPLC con detección conductimétrica o amperométrica, espectroscopía en UV-Vis, infrarrojo, Raman o resonancia magnética nuclear, y electroforesis en zona capilar acoplado a detección de fotodiodo array, o cromatografía capilar de micelular electrocinética. En ellos se engloban impurezas inorgánicas, como sulfatos o cloruros, y metales, utilizando técnicas como la espectroscopía atómica, a través de rayos X fluorescentes. También por la fácil reducción de azoicos, triarilmetano y colorantes índigo, puede utilizarse cloruro de estaño (II). La determinación de metales se lleva a cabo con espectroscopía atómica, a través de rayos X fluorescentes. También, para trazas de colorantes orgánicos se utiliza una extracción Soxhlet, para aminas primarias aromáticas, determinadas por HPLC-MS. (Scotter, 2015)

Tabla 6. Técnicas de determinación de colorantes sintéticos en alimentos más empleadas.

Técnica	Descripción
<p>Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS)</p>	<p>El más usado es en fase reversa, con una fase estacionaria no polar, C8 o C18. La fase móvil es polar. Hay dos modos de trabajo, en modo isocrático, si no varía la composición del eluyente, mientras que en gradiente de elución, varía la composición del eluyente, arrastrando así aquellos compuestos en función de su solubilidad en el eluyente. La fase móvil más utilizada es acetato amónico y metanol, aunque también acetonitrilo y acetato sódico, con un porcentaje en ácido fórmico para fomentar la ionización de compuestos. Se puede acoplar detectores como detector fotodiodo array (DAD), UV, pero el más común es la espectroscopía de masas equipado con una interfase de ionización con electrospray (ESI), trabajando en modo positivo y negativo, y un analizador en tiempo de vuelo (Q-TOF). Esto es así puesto que es un método robusto, reproducible y buen separador, proporcionando bajos resultados de límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD). Otros equipos añadidos son ionización química a presión atmosférica (APCI), incluso detección por trampa iónica y cuadrupolo (triple).</p>
<p>Cromatografía en capa fina (TLC)</p>	<p>La cromatografía en capa fina es rápida, poco costosa y un método eficiente de la simulación de la separación de muchos tipos de compuestos, es decir, es un análisis cualitativo, suele utilizarse antes de HPLC. También puede usarse en fase reversa.</p>
<p>Electroforesis capilar (CE)</p>	<p>Usada en análisis para separar pequeñas y grandes moléculas en un tubo capilar que contiene una disolución buffer aplicando un campo eléctrico. El buffer de fosfato es el más utilizado en esta técnica, ya que es un buen separador de colorantes sintéticos. Es rápido y de bajo coste. Existen otras técnicas como electrocinética micelar, electroforesis capilar en zona, isoelectroenfoque capilar y electroforesis capilar en gel. Se emplea como detector un espectrómetro de UV-Vis.</p>
<p>Inmunoanálisis</p>	<p>Está basado en la unión de un anticuerpo al analito a analizar para identificarlo y cuantificar su concentración. Se ahorra tiempo, es más barato, además no requiere una limpieza de la muestra. Es una técnica sensible y específica, para pequeñas concentraciones de analitos en muestras con matrices complejas que no requieren un pretratamiento. La enzima que se suele utilizar se denomina enzima-unidora inmunoabsorbente (ELISA), también se utilizan anticuerpos policlonales. Se usa en muestras de chile en polvo, chile o cerdo a la brasa. (Rovina <i>et al.</i>, 2017)</p>

Tabla 7. Resumen de los principales métodos analíticos para la determinación de colorantes artificiales.

Analito(s)	Matriz	Tratamiento de muestras	Determinación	Referencia
Sudan I-IV	Chile, curry, aceite de palma, carne congelada	SPE	Absorción UV-Vis	Rebane <i>et al.</i> , 2010
Sudan I-IV	Multimatrices	CPG	HPLC-ESI-MS	Sun <i>et al.</i> , 2007
Tartracina, Amaranto, Azul Brillante FCF, Rojo Allura AC, Sudan I-IV	Almíbar	Extracción con acetonitrilo + filtración	HPLC-ESI-MS	Tsai <i>et al.</i> , 2015
Tartracina, Amaranto, Ponceau 4R, Amarillo anaranjado, Sudan I-IV	Refresco	Desgasificación + filtración	HPLC-DAD-ESI-MS	Ma <i>et al.</i> , 2006

Azorubina, Amaranto	Yogurt, leche	Extracción + centrifugación	HPLC-DAD	Bento <i>et al.</i> , 2015
Sudan I-IV	Polvod de chile, curcumina, curry	Extracción líquida a presión + CPG	HPLC-ESI-MS/MS	Pardo <i>et al.</i> , 2009
Amarillo anaranjado, Carmoisina, Ponceau 4R	Helado	Extracción + filtración	CE-DAD	Del Giovine and Bocca, 2003
Tartracina, Amaranto, Rojo Allura AC, Carmoisina, Azul Brillante FCF, Sudán I-IV	Caramelos blandos, gelatinas	5-10 g; disolver en 50 mL de agua y calentar a 60°C, agitando con un agitador magnético	HPLC-ESI-MS-TOF	Harp, 2012
Rojo Allura AC	Agua	CPG	Absorción UV-Vis	Soylak <i>et al.</i> , 2011 ¹

¹ CE: Electroforesis capilar; CPG: Cromatografía de gel permeable; DAD: Detector fotodiodo array; ESI: ionización con electrospray; HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución; MS: Espectrometría de masas; SPE: Extracción en fase sólida; TOF; Analizador de tiempo de vuelo; UV-Vis: ultravioleta-visible.

3.- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de fin de grado es la determinación de colorantes sintéticos en alimentos, en concreto, aquellos cuya utilización presenta cierta controversia por el potencial riesgo para la salud como la hiperactividad en niños o incluso aquellos que se encuentran fuera de la legislación.

La cromatografía de líquidos/espectrometría de masas combinada con un procedimiento de preparación de muestra adecuado puede permitir la determinación de forma sensible y selectiva de colorantes alimentarios en alimentos. Tras el desarrollo y adaptación de la metodología analítica a partir de estudios previos, se aplicará el método desarrollado al análisis de muestras tales como golosinas líquidas, golosinas sólidas blandas, gelatinas y gel.

4.- EXPERIMENTAL

4.1.- Materiales y reactivos

Para la pesada de muestras, tales como golosinas, se utilizó la balanza analítica. Para tomar los líquidos se utilizan micropipetas 10-1000 μL o 1-5 mL. Para desgasificar muestras gaseosas se usa unos ultrasonidos Ultrasons H-D P-Selecta.

En el caso de disolver muestras semisólidas en agua, se utiliza una placa calefactora con agitación magnética.

La extracción en fase sólida fue realizada sobre cartuchos Superclean L-C18 (500 mg, 6 mL) y jeringas de 10 ml con adaptadores. Los disolventes empleados fueron de calidad HPLC-MS (Sigma-Aldrich), tales como agua (H_2O), metanol (MeOH), isopropanol, ácido fórmico, acetonitrilo (ACN). Los residuos fueron recogidos sobre un vaso de precipitado, mientras que el eluato fue recogido sobre un tubo de ensayo o tubos falcon. Para llevarlo a casi sequedad se utilizó un evaporador TurboVap LV (Caliper), con un baño de agua a 40°C y una atmósfera de nitrógeno. Tras la reconstitución, se homogeniza la mezcla con un Vortex.

En algún caso de precipitación, se centrifuga el eluato en una Centrífuga Sigma.

A partir de disolución de 200 mg/L de cada analito, se preparó una disolución mezcla de todos los analitos intermedia de 4 mg/L de cada analito en metanol, y a partir de esta

disolución, se hacían diluciones dentro del intervalo de concentraciones entre 10 y 1000 µg/L empleando MeOH:H₂O (25:75) como disolvente. Dichas diluciones se prepararon en viales de 2 mL para llevar a cabo su análisis mediante HPLC- MS.

4.2.- Tratamiento de muestra

El tratamiento se realizó sobre veinte muestras, líquidas y semisólidas. En todos los casos, el procedimiento incluido comprende dos etapas: (i) etapa de homogeneización y disolución; (ii) etapa de purificación o *cleanup*. Esta segunda etapa siempre se efectuaba a través de una etapa de extracción en fase sólida.

4.2.1. Tratamiento previo de homogeneización y disolución

A continuación se describen los tratamientos efectuados según la muestra:

- La bebida gaseosa fue desgasificada 10 min. en ultrasonidos.
- Para la gelatina se tomó 5-10 g en una balanza analítica y se disuelven en 50 mL de agua a 60°C con una placa calefactora y un agitador magnético. Al estar tan diluida, no sigue la dilución correspondiente a la SPE, sino que directamente se llevó a un tubo de ensayo 10 mL.
- Los colorantes de tarta fue tomado 1 mL sobre un tubo falcon, ya que es un gel, y al ser tan puro, se lleva a 10 mL (1:10), y posteriormente, se toma 1 mL y se lleva a 10 mL (1:100), y una última dilución a 1:1000, con 1 mL de la dilución anterior llevados a 10 mL, no sigue la dilución correspondiente a la SPE.
- Los caramelos blandos se pesaron 5-10 g, disolviéndose en 50 mL de agua a 60°C y con un agitador magnético.
- Para el resto de muestras líquidas, se sigue directamente a la segunda etapa.

4.2.2. Etapa de purificación con SPE

De las muestras o extractos una vez líquidos, se tomaba 1 mL de cada una de ellas con una micropipeta y se diluían 1:9 (v/v) con agua en un tubo de ensayo a 10 mL. Posteriormente, se lleva a cabo la extracción en fase sólida para eliminar impurezas y otros interferentes presentes en la matriz de los alimentos, como por ejemplo

espesantes, azúcares, etc. Las distintas etapas de la SPE fueron:

1. Acondicionamiento: El cartucho es acondicionado con 1 mL de MeOH por triplicado, con un flujo de 3 mL/min seguido de 1 mL de agua, por triplicado también, con un flujo de 4 mL/min.
2. Carga de muestra: Se añaden 10 mL de muestra con dilución (1:10) sobre el cartucho a un flujo de 1 mL/min.
3. Lavado: Se pasan por el cartucho 1 mL de agua por duplicado, con un flujo de 4 mL/min, para así eliminar algún resto indeseado que haya quedado en el cartucho.
4. Elución: En esta etapa se añade 1 mL de isopropanol, por triplicado, a un flujo de 0.85 mL/min, recogiendo el eluato sobre un tubo de ensayo. Se homogeneiza en el Vortex. (**Figura 1**)
5. Evaporación del disolvente: En un evaporador se evapora el disolvente hasta llevar el eluato casi a sequedad.
6. Reconstitución del extracto: Sobre el tubo de ensayo se añaden 10 mL de una disolución MeOH:H₂O (25:75), agitando en el Vortex para así homogeneizarlo. Estas muestras tienen una dilución 1:10, por lo que se realiza una nueva dilución 1:50, preparándose con la misma disolución MeOH:H₂O.



Figura 1. Etapa de elución sobre dos muestras.

4.3.- Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (HPLC-TOFMS)

El sistema empleado fue la cromatografía de líquidos HPLC (Agilent Series 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La columna cromatográfica es de fase reversa C₁₈ de 3,0 mm x 100 mm y 1,8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse Plus C18, Rapid Resolution H-D, Agilent Technologies, USA).

Las fases móviles empleadas fueron agua (A) y ACN (B), respectivamente, con 0,1% de ácido fórmico. El flujo empleado en el equipo fue de 0,4 mL/min, con un modo de trabajo en elución en gradiente (**Figura 2**). El volumen inyectado (de los patrones o de las muestras) en la columna era de 10 µL, empleando el modo “flush port”, en el que la aguja se lava a posteriori durante 7 segundos con MeOH. El tiempo total de análisis fue de 25 minutos, seguido de un acondicionamiento/re-equilibrado de la columna durante 10 minutos.

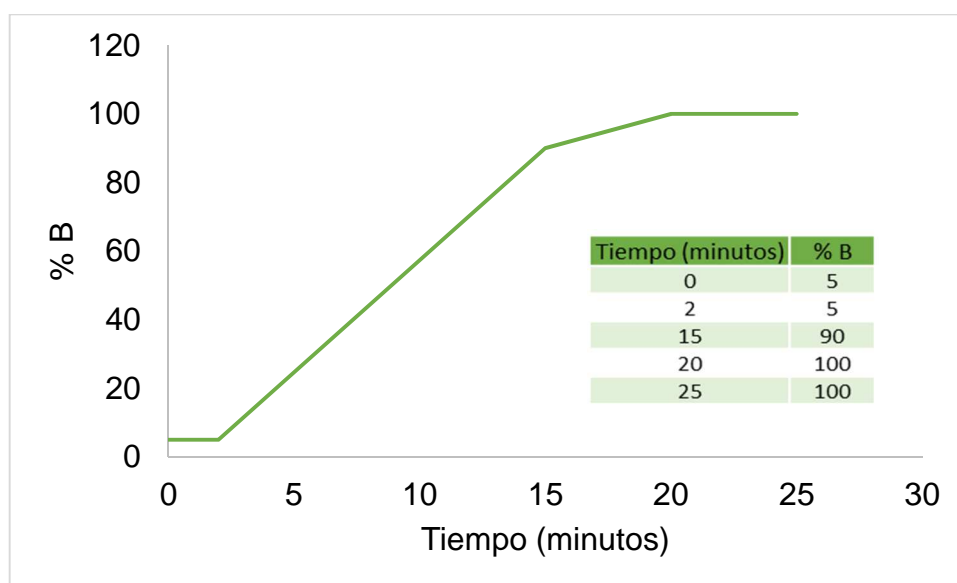


Figura 2. Gradiente de elución empleado en el equipo.

El espectrómetro de masas empleado era de alta resolución con un analizador de tiempo de vuelo Agilent 6220 TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) dotado de una fuente de ionización electrospray (ESI), que se empleó tanto en modo positivo como en modo negativo (**Tabla 8**). En la **Figura 3** se puede observar el equipo empleado.

Tabla 8. Parámetros de trabajo en la fuente de ionización y espectrómetro de masas.

Voltaje del capilar	4000 V
Voltaje de fragmentación	170 V
Presión del gas de nebulización	40 psi
Caudal del gas de secado	9,0 L/min
Temperatura del gas de secado	300°C
Rango de masas	50-1100 m/z

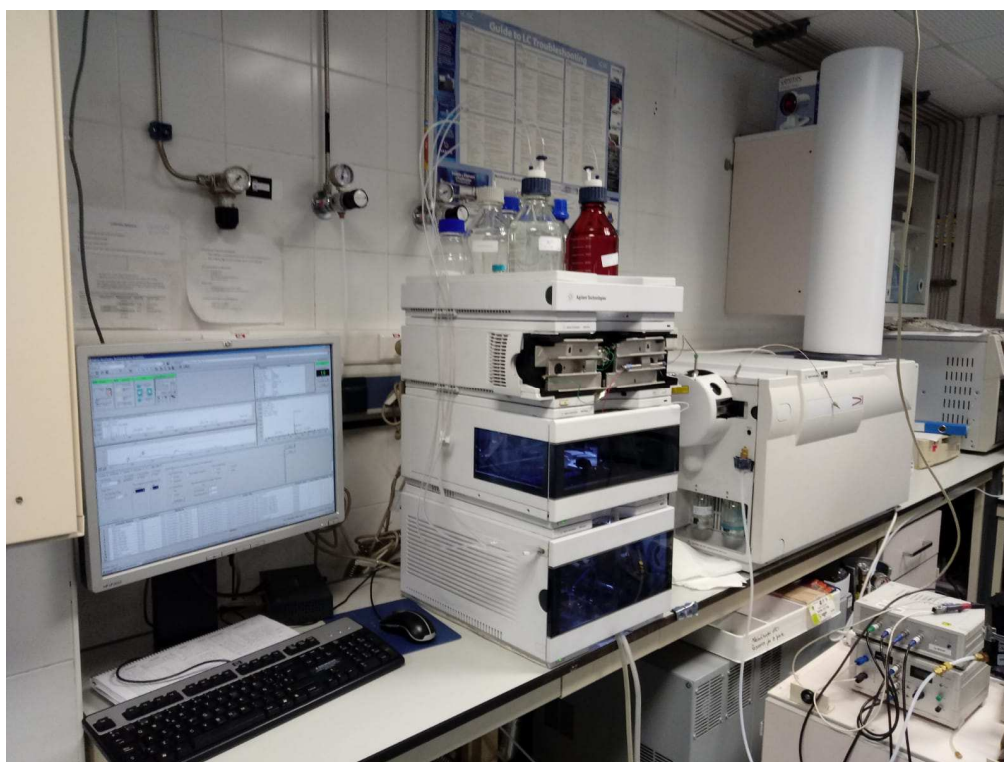


Figura 3. Equipo cromatográfico con espectrómetro de masas y analizador en tiempo de vuelo.

5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1.- Método aplicado

El método HPLC-TOFMS empleado en este trabajo está basado en un método descrito anteriormente (García Martínez, 2018), realizando las modificaciones oportunas. Empleando electrospray en modo positivo y negativo y columna de fase reversa empleando gradiente de elución, se procedieron a identificar los tiempos de retención para cada colorante sintético estudiado. En él, una vez inyectados los patrones, se obtuvo el TIC (*Total Ion Current*) tanto en modo positivo, como en negativo. A partir del mismo, se realizó el EIC (*Extracted Ion Chromatogram*), en los mismos modos anteriores, positivo y negativo, observando así para cada colorante las distintas ionizaciones (**Tabla 9**).

Se trabajó en modo positivo y negativo ente el minuto 0 y 25 minutos, puesto que son los tiempos necesarios para la detección de los diferentes colorantes según su capacidad de ser ionizados. Los compuestos Tartracina y Sudán (I-IV) aparecen en el modo positivo, mientras que en modo negativo surgen Amarillo de quinoleína (mono- y disulfónico), Amararillo anaranjado, Carmoisina, Ácido carmínico, Rojo Allura AC y Azul Brillante FCF. En la **Figura 4** se puede apreciar los cromatogramas TIC y EIC, tanto en modo positivo, como en negativo, p. ej. en una disolución mezcla patrón de concentración 1000 µg/L.

Tabla 9. Colorantes sintéticos determinados, fórmula molecular, relación masa-carga (m/z) y tiempos de retención.

	Compuesto	Fórmula molecular	Ión detectado	m/z	T_R (minutos)
1	Tartracina	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	$[M+H]^+$	469,0118	4,81
2	Amarillo de quinoleína (disulfónico)	$C_{18}H_9NO_8S_2Na_2$	$[M-H]^-$	215,4890	5,49
3	Amarillo anaranjado	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	$[M-2H]^{2-}$	202,9970	5,85
4	Ácido carmínico	$C_{22}H_{20}O_{13}$	$[M-H]^-$	491,0831	6,20
5	Rojo Allura AC	$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$	$[M-2H]^{2-}$	225,0101	6,38
6	Carmoisina	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	$[M-2H]^{2-}$	228,0048	7,63
7	Azul Brillante FCF	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	$[M-2H]^{2-}$	373,0719	7,80
8	Amarillo de quinoleína (monosulfónico)	$C_{18}H_{11}NO_5SNa$	$[M-2H]^{2-}$	352,0285	8,17
9	Sudán I	$C_{16}H_{12}N_2O$	$[M+H]^+$	249,1022	15,76
10	Sudán II	$C_{18}H_{16}N_2O$	$[M+H]^+$	277,1335	17,67
11	Sudán III	$C_{22}H_{16}N_4O$	$[M+H]^+$	353,1397	18,98
12	Sudán IV	$C_{24}H_{20}N_4O$	$[M+H]^+$	381,1710	21,22

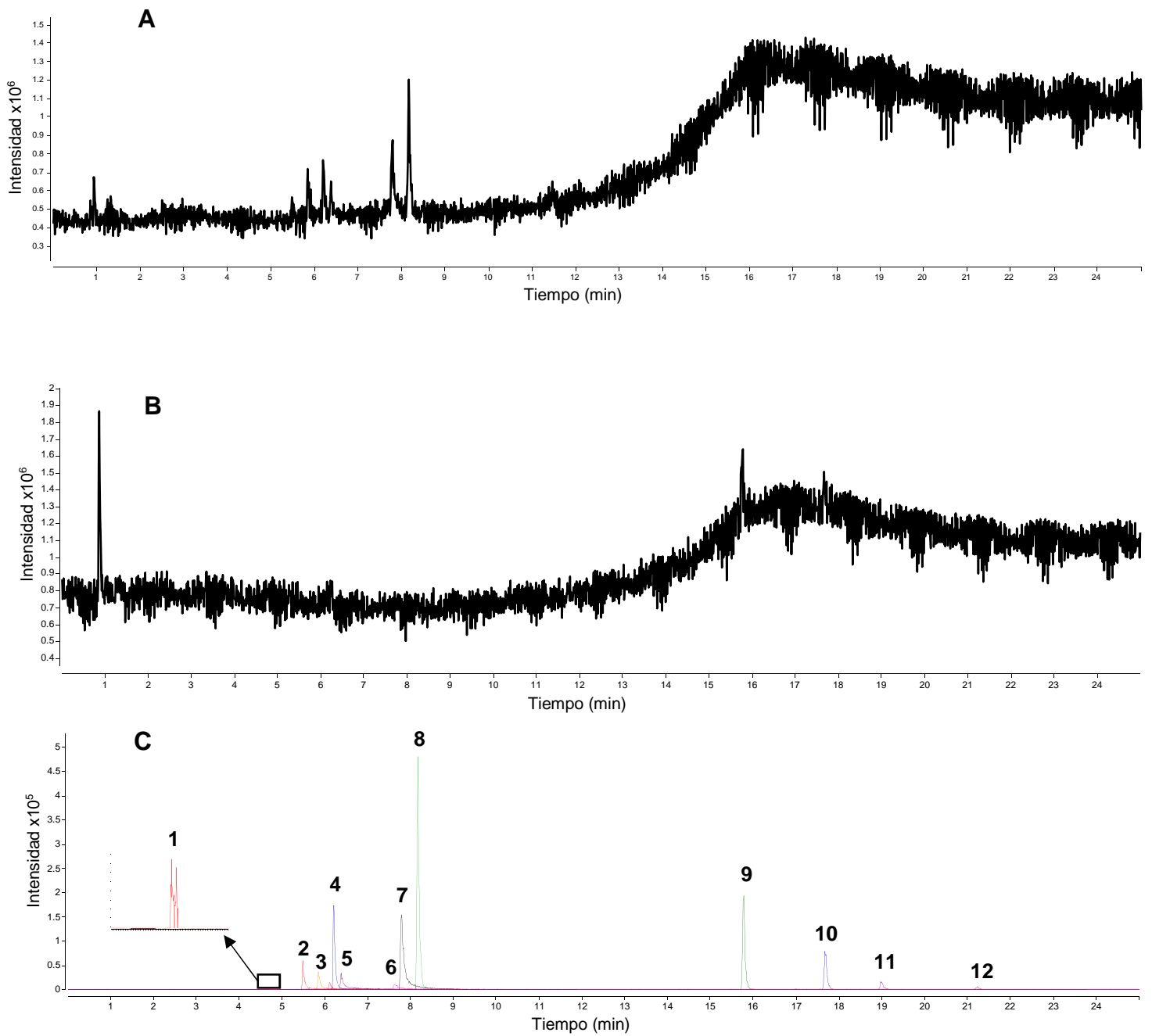


Figura 4. TICs (A y B, negativo y positivo, respectivamente) y EICs (C) de picos superpuestos en modo positivo y negativo de todos los colorantes sintéticos estudiados. Correspondencia: 1: Tartracina; 2: Amarillo de quinoleína (disulfónico); 3: Amarillo anaranjado; 4: Ácido carmínico; 5: Rojo Allura AC; 6: Carmoisina; 7: Azul Brillantes FCF; 8: Amarillo de quinoleína (monosulfónico); 9: Sudán I; 10: Sudán II; 11: Sudán III; 12: Sudán IV.

5.2.- Parámetros analíticos

Entre los distintos parámetros analíticos a examinar, tanto el límite de detección (LOD) como el de cuantificación (LOQ), además del intervalo dinámico lineal y los coeficientes de regresión, se muestran en la **Tabla 10**.

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados para cada compuesto. En el caso de la cromatografía, sobre el EIC, para calcular el LOD se toma la mínima concentración detectada, se multiplica por 3 y se divide de la relación señal/ruido (S/N); en el caso del límite de cuantificación, la mínima concentración detectada se multiplica por 10 y se divide por la señal/ruido (**Ecuación 1**).

$$LOD = \frac{[Concentración]_{mínima} * 3}{S/N} \quad LOQ = \frac{[Concentración]_{mínima} * 10}{S/N}$$

Ecuación 1. Cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

Respecto al cálculo del rango lineal, además de la linealidad, fue realizada a partir de las curvas de calibrado realizada con los estándares de cada analito, con un rango de concentraciones 10-1000 µg/L. Los valores del área bajo el pico se obtuvieron para representar los gráficos. Para el rango lineal, el límite inferior está determinado por el LOQ, sin embargo, el límite superior lo determina el último punto de la curva de calibrado mientras que este no pierda la linealidad.

En la siguiente **Tabla 10** pueden observarse los parámetros analíticos estudiados, a excepción de la Tartracina, el rango lineal debe obtenerse a partir del único punto de 1000 µg/L, lo cual implica la imposibilidad de poder cuantificar las muestras reales.

Tabla 10. Parámetros analíticos estudiados.

Compuesto	Rango lineal (µg/L)	Pendiente	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Tartracina	-	9,5	1	405,4	1351
Amarillo de Quinoleína (disulfónico)	10,6-1000	176,5	0,9840	3,2	10,6
Amarillo anaranjado	58,8-1000	175,8	0,9965	17,7	58,8
Ácido carmínico	6,4-1000	597,4	0,9889	1,9	6,4
Rojo Allura AC	79,4-1000	194,4	0,9925	23,8	79,4
Carmoisina	75,2-1000	144,6	0,9805	22,6	75,2
Azul Brillante FCF	5,1-1000	911,7	0,9824	1,5	5,1
Amarillo de quinoleína (monosulfónico)	1,7-1000	1619,5	0,9841	0,5	1,7
Sudán I	19,6-1000	764,4	0,9946	5,9	19,6
Sudán II	28,6-1000	337,4	0,9913	8,6	28,6
Sudán III	82,0-750	103,9	0,9993	24,6	82,0
Sudán IV	119-1000	26,3	0,9976	35,7	119

5.3.- Aplicación a muestras reales

El método descrito anteriormente se aplicó en diferentes muestras reales, como golosinas líquidas y semisólidas, gelatina, colorantes de confitería, bebidas gaseosas. El objetivo era detectar y cuantificar los colorantes sintéticos estudiados en estas muestras por interpolación en las curvas de calibrado. Como la dilución efectuada de la muestra era muy alta, no era necesario llevar a cabo calibración en matriz o por adición de patrón, ya que los efectos matriz eran despreciables. Se analizaron hasta 20 muestras de distintos colores, de entre los cuales pueden encontrarse etiquetados con los siguientes códigos E: E-133, E-104, E-122, E-120, E-102, E-129, entre otros.

- Muestra 1: color morado
- Muestra 2: color verde
- Muestra 3: color naranja
- Muestra 4: color amarillo
- Muestra 5: color rojo
- Muestra 6: color verde
- Muestra 7: color azul
- Muestra 8: color amarillo
- Muestra 9: color rojo
- Muestra 10: color verde
- Muestra 11: color amarillo
- Muestra 12: color rojo
- Muestra 13: color azul
- Muestra 14: color rojo
- Muestra 15: color marrón
- Muestra 16: color marrón
- Muestra 17: color rojo
- Muestra 18: color naranja
- Muestra 19: color rojo
- Muestra 20: color azul

Con el tratamiento aplicado en el apartado 4.2, y aplicando el método HPLC-MS en el apartado 4.3, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Datos experimentales referidos a los colorantes sintéticos detectados en muestras reales. (*) Concentración real de las muestras en g/L.

M	Compuesto	T _R (min)	Fórmula	Ión detectado	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)	Concentración (mg/L)
1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	Azul Brillante	7,8	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	[M-2H] ²⁻	373,0719	373,0741	5,9	5,21*
8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9	Ácido carmínico	6,21	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	491,0831	491,0846	3,0	1,37*
10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	Azul Brillante	7,82	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	[M-2H] ²⁻	373,0719	373,0828	29,2	37,2
14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	Azul Brillante	7,8	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	[M-2H] ²⁻	373,0719	373,0883	43,9	28,2

Para una correcta identificación de los analitos, las etapas a seguir son las siguientes, con ayuda del programa informático Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (**Figura 5**):

- I. Partiendo del cromatograma TIC para cada muestra,
- II. Se extrae el cromatograma EIC, utilizando la relación masa-carga (m/z) que corresponda con cada analito, hasta cuatro cifras decimales.
- III. Obtención del espectro de masas del pico cromatográfico, es decir, se integra el EIC y partiendo del pico, se obtiene el espectro de masas, buscando así un pico con m/z experimental que corresponda con el ión de estudio.
- IV. Calcular el error, en partes por millón (ppm), de la diferencia de m/z experimental con m/z teórica. Debe ser igual o inferior a 10 ppm, para así comprobar que no es otro ión el obtenido (**Ecuación 2**):

$$|\text{Error (ppm)}| = \left| \frac{m/z[M + H]^+ \text{experimental} - m/z[M + H]^+ \text{teórica}}{m/z[M + H]^+ \text{teórica}} * 10^6 \right| \leq 10 \text{ ppm}$$

Ecuación 2. Cálculo del error relativo (ppm); relación m/z .

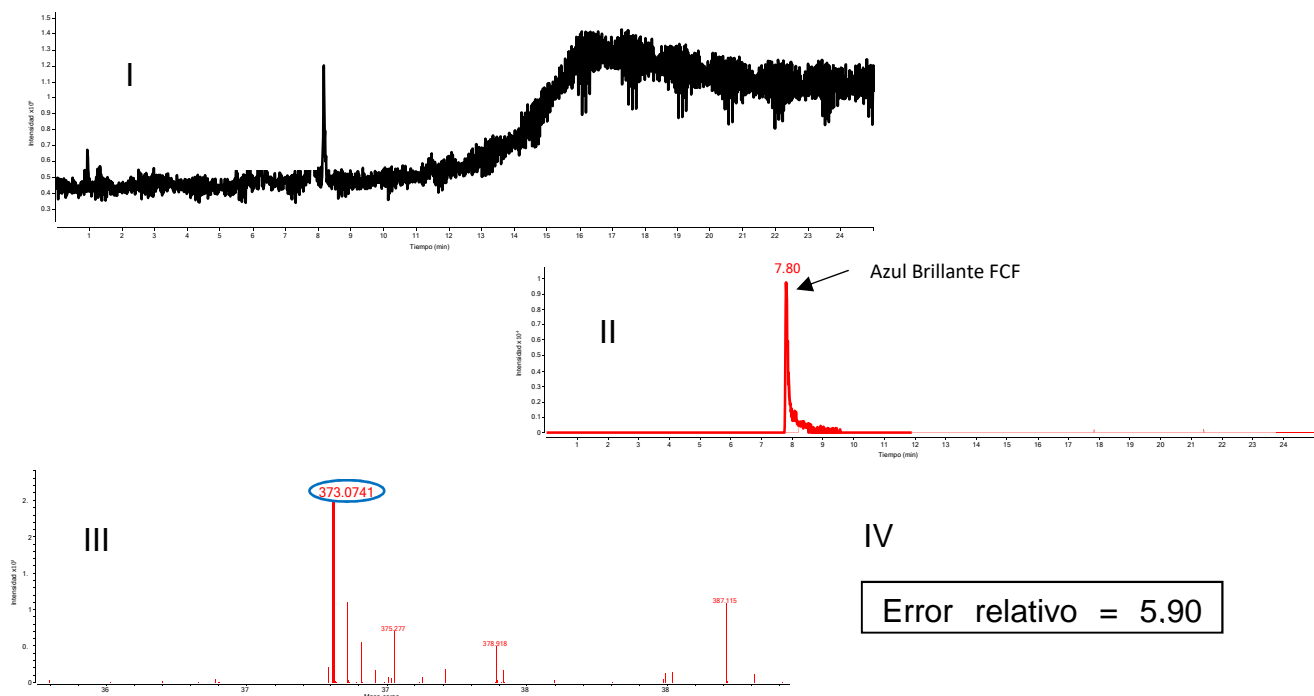
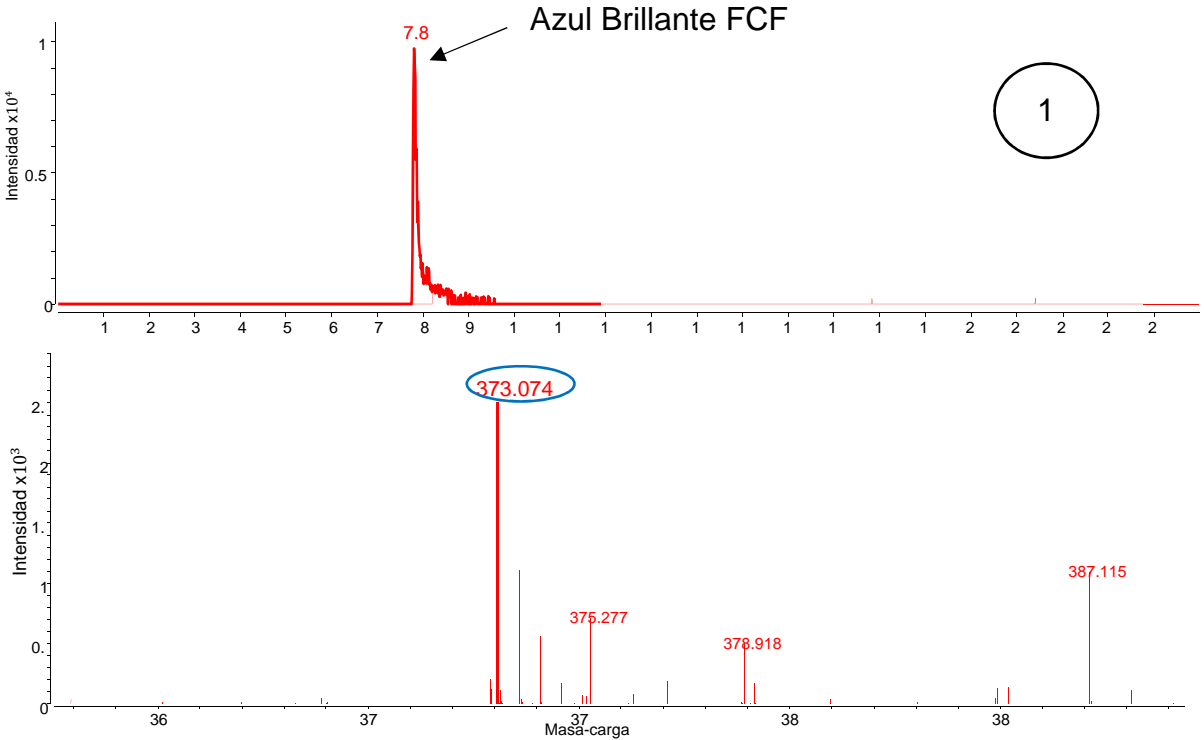
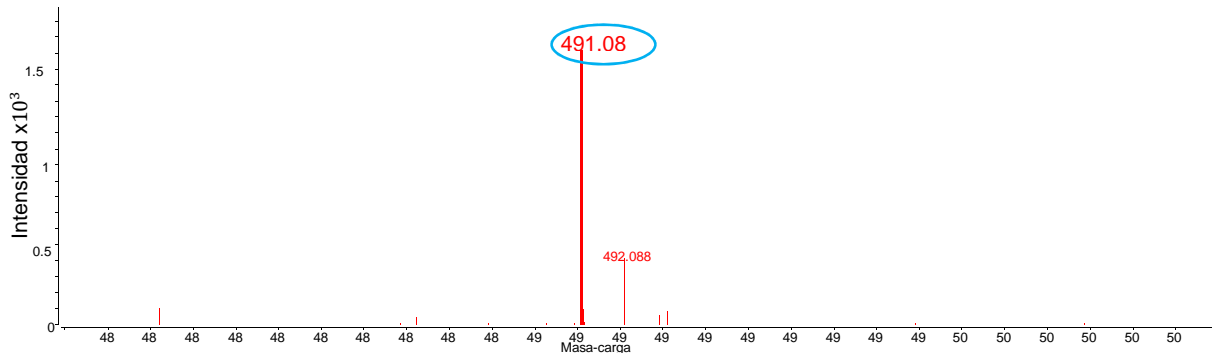
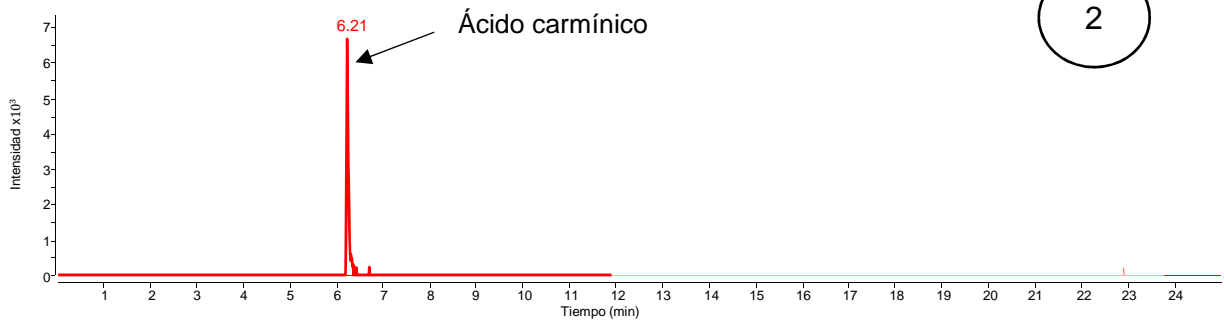


Figura 5. Identificación de Azul Brillante FCF en la muestra 7.

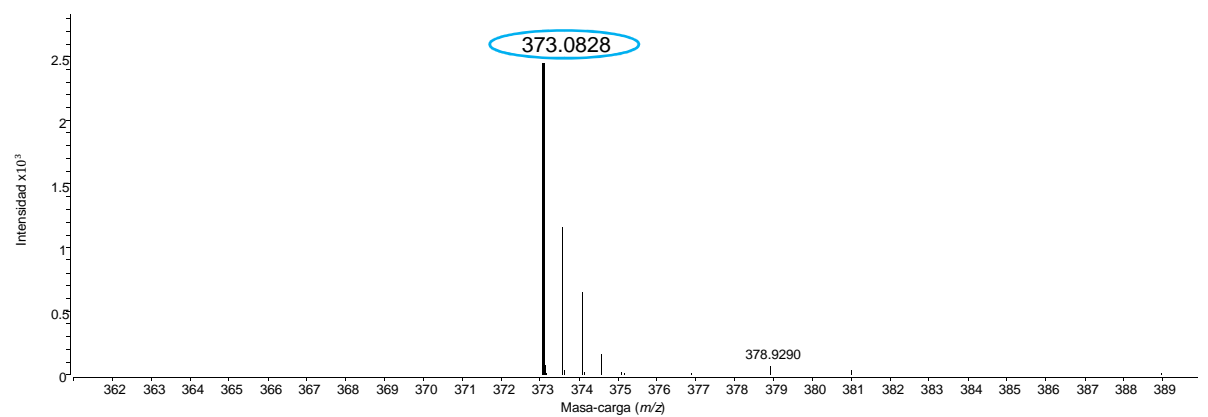
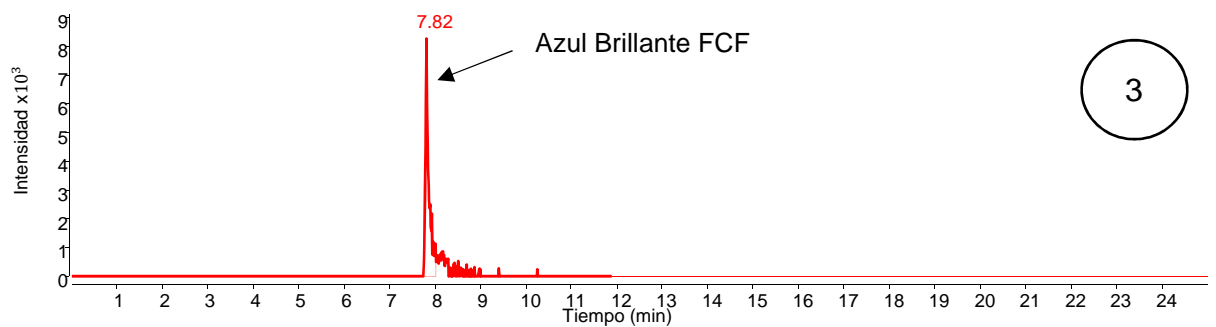
En la siguiente **Figura 6** se pueden observar los EICs de las distintas muestras de las cuales se obtuvo un pico correspondiente a un colorante sintético, con sus respectivos espectros de masas. En la muestra 7, se obtuvo un pico correspondiente a Azul Brillante FCF (1) con una concentración de 5,21 g/L; en la muestra 9, apareció un pico de Ácido Carmínico (2) con una concentración de 1,37 g/L, en la muestra 13, resultó un pico correspondiente a Azul Brillante FCF (3) con una concentración de 37,23 mg/L, En la muestra 20, se obtuvo un pico correspondiente a Azul Brillante FCF (4) con una concentración de 28,22 mg/L.



2



3



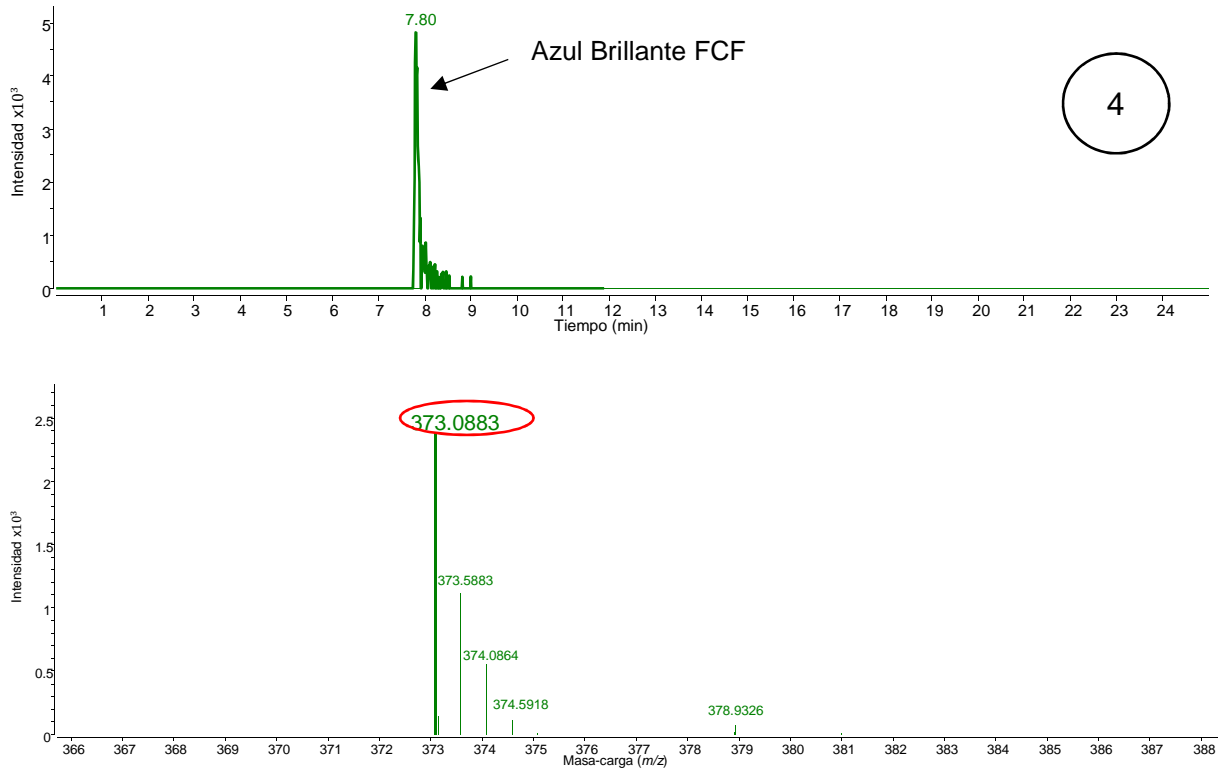


Figura 6. Cromatogramas EIC y espectros de masas correspondientes a Azul Brillante (1), con m/z 373,0741, Ácido Carmínico (2) con m/z 491,0846, Azul Brillante (3), con m/z 373,0828, Azul Brillante (4), con m/z 373,0883.

En la siguiente **Tabla 12** están representados los colorantes artificiales, en función de su código E, además de si ha sido detectada y cuantificada o no (No Determinado, N.D.) en las muestras estudiadas.

Tabla 12. Determinación de colorantes sintéticos en las muestras.

Colorante	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
E-102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-104	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-120	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,37 g/L	N.D.
E-122	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-129	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-133	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5,21 g/L	N.D.	N.D.	N.D.

Colorante	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
E-102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-104	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-120	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-122	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-129	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-133	N.D.	N.D.	37,2 mg/L	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	28,2 mg/L

También se puede conocer las cantidades añadidas de estos colorantes sintéticos a las muestras en cada envase que las contiene, a partir de las concentraciones calculadas para los colorantes Azul Brillante FCF (E-133) y Ácido Carmínico (E-120). Para las muestras 7 y 9, cada envase contiene 10 g, para la muestra 13, el envase contiene 60 mL, y para la muestra 20, el envase contiene 40 mL.

- Muestra 7: El nivel de Azul Brillante FCF es de 5,21 g/L, estando por encima del límite máximo (100 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). Tomando que en cada envase contiene 10 g de gel, aproximadamente con la densidad de 0,80 g/mL, un volumen aproximado de 13 mL, hay una cantidad de 67,73 mg en cada envase. La cantidad diaria recomendada por la Unión Europea (EFSA) para un niño o niña de 8 años, con un peso aproximado de 23,5 kg (6 mg/kg de peso corporal), sería de 141 mg, por lo que, debería consumir alrededor de 2 envases para que pueda producir un riesgo importante en la salud.

- Muestra 9: La concentración de Ácido Carmínico es de 1,37 g/L, estando por encima del límite máximo (100 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). Si cada envase contiene 10 g de gel, aproximadamente con la densidad de 0,80 g/mL, un volumen aproximado de 13 mL, hay una cantidad de 67,73 mg en cada envase. La cantidad diaria recomendada por la Unión Europea (EFSA) para un niño o niña de 8 años, con un peso aproximado de 23,5 kg (2,5 mg/kg de peso corporal), sería de 58,75 mg, por lo que, no debería consumir ni siquiera 1 envase para que pueda producir un riesgo importante en la salud.

- Muestra 13: Se ha detectado una concentración de Azul Brillante FCF de 37,2 mg/L, estando por debajo del límite máximo (100 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). Tomando que el envase contiene 60 mL, hay una cantidad de 2,23 mg en el envase. La cantidad diaria recomendada por la Unión Europea (EFSA) para un niño o niña de 8 años, con un peso aproximado de 23,5 kg (6 mg/kg de peso corporal), sería de 141 mg, por lo que, debería consumir alrededor de 63 envases para que pueda producir un riesgo importante en la salud.

- Muestra 20: Los niveles de Azul Brillante FCF de 28,2 mg/L, estando por debajo del límite máximo (100 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). Tomando que el envase contiene 40 mL, hay una cantidad de 1,13 mg en el envase. La cantidad diaria recomendada por la Unión Europea (EFSA) para un niño o niña de 8 años, con un peso aproximado de 23,5 kg (6 mg/kg de peso corporal), sería de 141 mg, por lo que, debería consumir alrededor de 125 envases para que pueda producir un riesgo importante en la salud.

6.- CONCLUSIONES

En este trabajo fin de grado se ha aplicado un método HPLC-MS de alta resolución empleando ionización por electrospray y analizador de tiempo de vuelo para la determinación de colorantes sintéticos en productos como golosinas líquidas y semisólidas, además de gelatinas y bebidas gaseosas. Los colorantes sintéticos estudiados fueron 12 (Tartracina, Amarillo de quinoleína (disulfónico y monosulfónico), Ácido Carmínico, Rojo Allura AC, Carmoisina, Azul Brillante FCF, Sudán (I-IV), Amarillo Anaranjado). Para poder aplicar dicho método, las muestras tuvieron un tratamiento de muestra como desgasificación, disolución, seguido de una etapa de purificación extracción en fase sólida, este último común a todas ellas, para aislar y purificar los colorantes del resto de compuestos presentes en las muestras reales. En función del color observado en las muestras y el etiquetado de las mismas, se corrobora la presencia de colorantes sintéticos en su composición. Con ello, la muestra 7, 13 y 20 contienen Azul Brillante FCF (color azul) en una concentración de 5,21 g/L, 37,2 mg/L y 28,2 mg/L, respectivamente, mientras que la muestra 9 presenta un color rojo, característico del Ácido carmínico, en una concentración de 1,37 g/L.

Respecto al resto de muestras, presentan otros colorantes, mayoritariamente de origen natural. Sin embargo, otros que utilizan colorantes de origen sintético, al ser compuestos de alta intensidad y elevada pureza y calidad, pequeñas cantidades proporcionan un color ideal, no pudiendo así detectarse con este método, puesto que sus concentraciones son menores a la del límite de detección.

Regido por la ley, y en cuanto a los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que:

- Las muestras 7 y 9 superan el límite máximo establecido por la EFSA, sin embargo, pueden ser considerados como ingredientes, puesto que son colorantes prácticamente puros.
- En el caso del resto de muestras con colorantes no detectados o bajo los límites establecidos por la EFSA, cumplen la normativa, siendo así permitido el consumo del alimento sin suponer un riesgo para la salud. Sin embargo, en algunos de los envases, la presencia de colorantes alimentarios sintéticos conllevan una información adicional en el etiquetado acerca del efecto negativo sobre la actividad de los niños.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ahlström, L.H., Spar Eskilsson, C., Björklund, E., Determination of banned azo dyes in consumer goods, *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (2005), 49-56.
- ❖ Badui Dergal, S., *Química de los alimentos*, 5^o ed., México: Pearson, 2013. 744 p. ISBN: 9786073215084
- ❖ Bento Siqueira, W. de A., Parente Lima, B., S. Paim, A.P., Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC, *Food Chemistry*, 183 (2015), 154-160.
- ❖ Castilla Fernández, D., “Determinación de antibióticos y otros productos veterinarios en productos lácteos de marca blanca”, 2017.
- ❖ Coultate, T., Blackburn, R.S., Food colorants: their past, present and future, *Coloration Technology*, 134 (2018), 166-186.
- ❖ Delgado Vargas, F., Paredes López, O., *Natural colorants for food and nutraceutical uses*, 1^o ed., Florida: CRC Press (2003), 327 p. ISBN: 1-58716-076-5
- ❖ Del Giovine, L & Piccioli Bocca, A., Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. *Food Control*. 10.1016/S0956-7135(02)00055-5. 14 (2003), 131-135.
- ❖ EFSA, Review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU, *The EFSA Journal*, 2005.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2010.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E 129) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2009.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Carminic acid (E 120) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2015.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Carmoisine (E 122) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2009.

- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Quinoline Yellow (E 104) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2009.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2009.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Tartrazine (E 102) as a food additive, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2009.
- ❖ Esteo Donaire, S., “Determinación de residuos de micotoxinas en alimentos mediante Cromatografía de Líquidos/Espectrometría de Masas”, 2018.
- ❖ García Martínez, J., “Determinación de colorantes alimentarios artificiales en alimentos”, 2018.
- ❖ Gostner, J.M., Becker, K., Ueberall, F., Fuchs, D., The good and bad of antioxidant foods - An immunological perspective -, Food and Chemical Toxicology, 80 (2015).
- ❖ Harp, B.P., Miranda-Bermudez, E., Baron, C.I., Richard, G.I., Qualitative identification of permitted and non-permitted colour additives in food products, Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 29:6 (2012), 886-896.
- ❖ Jiménez Aguilar, D.M., Ortega Regules, A.E., Lozada Ramírez, J.D., Pérez Pérez, C., Vernon Carter, E.J., Welti Chanes, J., Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material, 2011.
- ❖ Larry Branen, A., Michael Davidson, P., Seppo Salminen, Thorngate III, J.H., Food Additives, 2^o ed., Revised and Expanded, New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. 953 p. ISBN: 0-8247-9343-9
- ❖ Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., Yao, S., Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1179 (2008), 152-160.
- ❖ Martins, N., Lobo Roriz, C., Morales, P., Barros, L., C.F.C. Ferreira, I., Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices, Trends in Food Science & Technology, 52 (2016), 1-15

- ❖ Pardo, O., Yusà, V., León, N., Pastor, A., Development of method for the analysis of seven banned azo-dyes in chilli and hot chilli food samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Talanta*, 78 (2009), 178-186
- ❖ Pérez Ortega, P., “Desarrollo de bases de datos de masas exactas de iones para el control exhaustivo y automatizado de contaminantes en alimentos mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución”. Tesis Doctoral, 2015.
- ❖ Primo Yúfera, E., *Química de los alimentos*, España: Síntesis, 1998. 461 p. ISBN: 8477384517
- ❖ Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S., Herodes, K., A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010), 2747-2757.
- ❖ Rovina, K., Acung, L.A., Siddiquee, S., Akanda, J.H., Shaarani, S.Md., Extraction and Analytical Methods for Determination of Sunset Yellow (E110) – a Review, *Food Anal. Methods* 10 (2017), 773-787.
- ❖ Scotter, M.J., The Food and Environment Research Agency, York, United Kingdom, “Overview of EU regulations and safety assessment for food colours”, 2015.
- ❖ Scotter, M.J., The Food and Environment Research Agency, York, United Kingdom, “Methods of analysis for food colour additive quality and safety assessment”, 2015.
- ❖ Solymosi, K., Latruffe, N., Morant-Manceau, A., Schoefs; Eotvos Loránd B., University, Budapest, Hungary; University of Burgundy, Dijon, France; University of Le Mans, Le Mans, France. “Food colour additives of natural origin”, 2015.
- ❖ Sun, H., Wang, F., Ai, L., Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 1164 (2007), 120-128.
- ❖ Tsai, C., Kuo, C., Shih, D., Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23 (2005), 453-462.
- ❖ Wrolstad, R.E., Culver, C.A., *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 3 (2012) 59.

- ❖ Yamjala, K., Nainar, M.S., Remisetti, N.R., Methods for the analysis of azo-dyes employed in food industry – A review, *Food Chemistry*, 192 (2016), 813-824.