

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Alimentos

**INVESTIGACIÓN DEL MÉTODO DE  
CUANTIFICACIÓN DE TARTRAZINA**

Dyana Alejandra Paniagua Cabañas

Trabajo de Graduación presentado para optar al grado académico de Licenciatura en  
Ingeniería en Ciencias de los Alimentos

Guatemala  
2006



**INVESTIGACIÓN DEL MÉTODO DE  
CUANTIFICACIÓN DE TARTRAZINA**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Alimentos

**INVESTIGACIÓN DEL MÉTODO DE  
CUANTIFICACIÓN DE TARTRAZINA**

Dyana Alejandra Paniagua Cabañas

Trabajo de Graduación presentado para optar al grado académico de Licenciatura en  
Ingeniería en Ciencias de los Alimentos

Guatemala  
2006

Vo.Bo.:

(f)

---

Lic. Víctor Hugo Jiménez  
Asesor

Tribunal:

(f)

---

Licda. Patricia de Palomo

(f)

---

Licda. Ana Silvia de Ruiz

(f)

---

Lic. Víctor Hugo Jiménez

Fecha de aprobación:

8 de Diciembre del 2006

## CONTENIDO

	Página
Lista de gráficas	vi
Lista de cuadros	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. DISEÑO	3
A. Investigación	
a. Colorantes	3
i. Naturales	3
ii. Artificiales	3
b. Colorantes en alimentos	4
c. Toxicidad de colorantes	5
d. Métodos para la determinación de colorantes	6
e. Tartrazina: características, aplicaciones industriales, análisis de Laboratorio y toxicidad.	7
f. Normas para colorants	9
g. Refrescos líquidos sintéticos	10
i. Características	10
ii. Ingredientes	10
iii. Producción de los mismos	10
iv. Normas involucradas	11
h. Espectrofotometría	11
i. Absorbancia	11
IV. JUSTIFICACIÓN	12
V. METODOLOGÍA	13
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
VII. CÁLCULOS	15
A. Media aritmética	15

B.	Desviación estándar	15
C.	Coefficiente de correlación	15
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
IX.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
X.	BIBLIOGRAFÍA	26
XI.	ANEXOS	28

## **Lista de gráficas**

<b>Gráfica</b>	<b>Pág.</b>
• Grafica 1: Cinética 10ppm 2-10-2006	28
• Grafica 2: Curva de calibración	30
• Gráfica 3: Porcentaje de recuperación promedio	32

## **Lista de cuadros**

<b>Cuadros</b>	<b>Pág.</b>
• Cuadro 1: Cinética 10ppm	27
• Cuadro 2: Historial de curva de calibración	29
• Cuadro3: Datos estadísticos de historial de curva de calibración	29
• Cuadro4: Historial de recuperación	31
• Cuadro 5: Datos estadísticos de historial de recuperación	31

## RESUMEN

Durante este estudio, se realizó una investigación sobre la teoría de los colorantes artificiales, en la cual se detallan aspectos como toxicidad, usos, normas de aplicación, etc. Dada la variedad de colorantes presentes en el mercado nacional se escogió la tartrazina por su característica de alérgeno y su amplio uso en la elaboración de bebidas y alimentos en general. También se investigó sobre los refrescos sintéticos, que serían parte importante del estudio.

El desarrollo del mismo se realizó en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Salud, localizado en Bárcenas, Villa Nueva. Durante el desarrollo del estudio se encontraron diferentes dificultades como lo fueron los bajos porcentajes de recuperación en comparación con el método citado en la bibliografía (12). Luego de realizar varias pruebas para validar el resultado, se escogieron variables como fase móvil, fase estacionaria y solventes que podrían estar afectando los resultados. Al tener identificadas estas variables se realizaron más pruebas de recuperación sin tener cambios significativos. Se empezaron a combinar los factores para encontrar una combinación que aumentara los porcentajes de recuperación del método, sin encontrar nuevamente un resultado con recuperaciones aceptables (>90%).

El método constó en la lectura de la absorbancia de diferentes concentraciones conocidas de tartrazina en alcohol al 60% por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 425nm la cual es la longitud de onda máxima de la tartrazina de modo que las lecturas fuesen más exactas, para la elaboración de la curva de calibración. Luego se realizó todo el procedimiento con concentraciones conocidas del colorante de modo de obtener recuperaciones e identificar puntos de pérdida del color, al conocer la cantidad inicial y final del proceso.

Sin embargo al no encontrar una combinación de factores que reportaran la recuperación deseada se concluyó que la recuperación del método no era posible obtener.

## I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala cada vez es más importante la identificación de los colorantes artificiales utilizados en la industria alimentaria, debido al ingreso de productos fabricados en el exterior y que tienen un fácil ingreso. Los colorantes artificiales, han hecho que los alimentos tengan siempre una apariencia apetitosa, pues resaltan o mejoran el color original del alimento. Los niños son especialmente atraídos hacia colores vistosos en los diferentes alimentos. El color amarillo de la tartrazina es sumamente atractivo y versátil de combinar para crear otros matices, sin embargo a este color cada vez se le atribuyen mayores reacciones alérgicas, por lo que se cree importante investigarlo y trabajar con un método para cuantificar la cantidad de la tartrazina en refrescos sintéticos. Luego de investigar diversos métodos de cualificación de colorantes en alimentos, se encontró con un método novedoso presentado por Dr. Meeenakshi Tripathi para la cuantificación de colorantes, por lo que se utilizará el mismo como base para este estudio. Para la cuantificación de la tartrazina se realizarán y validarán por medio de repeticiones para garantizar la repetibilidad del método, barridos para identificar la longitud de onda máxima a la cual es leída la tartrazina por el espectrofotómetro, curvas de calibración, recuperación de estándares y de muestras de refrescos realizadas por el analista con concentraciones conocidas del colorante y por último una recuperación del color en muestras de refrescos sintéticos que se encuentren en el mercado nacional.

Para interpretar la información obtenida se utilizarán medias aritméticas, desviaciones estándar y coeficientes de correlación. Se utilizará una regresión lineal para encontrar la ecuación que refleje la tendencia de los niveles de absorbancia en función de cada concentración utilizada.

## II. OBJETIVOS

### A. Generales

- Investigar las condiciones del método para la cuantificación de tartrazina en alimentos

### B. Específicos

- Cuantificar tartrazina en refrescos líquidos sintéticos vendidos en la ciudad de Guatemala.
- Implementar un método de rutina para la cuantificación de colorantes en alimentos.
- Determinar límites de detección, límites de cuantificación en el método a implementar y otros parámetros para efectuar la validación del método.
- Determinar el grado de abuso por parte de la industria en la utilización del colorante tartrazina en refrescos sintéticos.

Investigar las características inherentes a los alimentos y posibles interferentes al trabajar durante la práctica del método

### III. DISEÑO

#### A. Colorantes

Los colorantes, también conocidos como anilinas, son sustancias que presentan la característica de poseer colores solubles en agua o disolventes orgánicos y tener grupos reactivos capaces de fijarse a los diversos sustratos, a los cuales se unen de una cierta forma química, comunicándoles color. Se denomina de esta forma a compuestos naturales o artificiales, adicionados a los alimentos para uniformizar su color o restituirlo cuando por algún tratamiento se haya disminuido o desaparecido. (7)

1. Naturales: Las definiciones de los colorantes naturales y artificiales han encontrado algunos obstáculos para diferenciarlos de manera adecuada. (7)

En sentido estricto, sólo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo. Esto puede generalizarse a los colorantes presentes de forma espontánea en otros alimentos y extraíbles de ellos, pero puede hacer confusa la situación de aquellas sustancias totalmente idénticas pero obtenidas por síntesis química. (7)

También la de colorantes obtenidos de materiales biológicos no alimentarios, insectos, por ejemplo, y la de aquellos que pueden bien añadirse o bien formarse espontáneamente al calentar un alimento, como es el caso del caramelo. Los colorantes naturales son considerados, en general, como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales. (7)

2. Artificiales: Los colorantes artificiales son aquellos que se obtienen por medios químicos para imitar a los que se encuentran en la naturaleza, sin embargo en los últimos años la preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión del público, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales. Además, son más resistentes que los colorantes naturales. (7)

Precisamente la preocupación por su seguridad ha hecho que los colorantes artificiales hayan sido estudiados en forma exhaustiva por lo que respecta a su efecto sobre la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales. Ello ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables, aunque al contrario de lo que sucede en los otros grupos de aditivos, existan grandes variaciones de un país a otro. (3)

Además cada colorante tiene por sí mismo un límite que varía según la sustancia de que se trate y del alimento en el que se utilice. Este tipo de colorantes deben reunir una serie de requisitos que aseguren su buen uso, entre los que se encuentran: ser inocuos, hidrosolubles, de fácil incorporación al producto, estables frente a la luz y al calor, indiferentes a cambios en el pH y a la presencia de agentes oxidantes/reductores, económicos, constituir una especie química definida y pura, poseer una buena capacidad de tinción, y no aportar olores ni sabores desagradables. (5a)

## **B. Colorantes en alimentos**

En los alimentos, los colorantes alimentarios son aditivos utilizados para hacer del alimento uno más atractivo para el consumidor, este puede ser usado para aumentar el color original del alimento. Se considera un colorante para alimento (5a):

Cualquier constituyente natural del alimento así como cualquier fuente natural, la cual no es normalmente consumida como tal ni tampoco usada como ingrediente alimentario. (5b)

Cada vez más, los colorantes naturales están siendo usados en los alimentos. Sin embargo los colorantes son utilizados principalmente para (5b):

- Contrarrestar la pérdida del color del alimento debido a los diferentes procesos de producción como lo son la exposición a la luz, al aire, a extremas condiciones de temperatura, a la humedad y a las condiciones de almacenamiento. (5b)

- Compensar las variaciones naturales de los alimentos usados como materias primas, así como también los efectos de su procesamiento y almacenamiento, con el fin de lograr los requerimientos del consumidor (Sin embargo, el enmascarar o disfrazar la baja calidad de un alimento es un uso inaceptable de los colorantes). (5b)
- Mejorar los colores que aparecen naturalmente en un alimento, pero a niveles menores que aquellos asociados usualmente con un producto en particular. (5b)

### **C. Toxicidad de colorantes**

No todo causa cáncer, por lo menos, no en las cantidades a las que estamos expuestos. Pero entre las miles de sustancias químicas que ocurren naturalmente o que se han usado en la manufactura de los alimentos hay algunos protagonistas que son peligrosos y que luego de diferentes análisis y de diferentes controversias se ha comprobado su toxicidad. (4a)

Se han realizado diferentes estudios con aditivos e ingredientes de los alimentos para comprobar su toxicidad o no. Sin embargo al no estar seguros de los mecanismos que causan las reacciones adversas ante estos ingredientes, los expertos indican que los colorantes no pueden ser catalogados dentro de los provocadores de alergias o intolerancias o intoxicaciones. Estos expertos han cuestionado la veracidad de los estudios realizados al comprobar que los sujetos en estudio han sido privados de medicamentos necesarios para que las enfermedades que sufren sean controladas (como asma o urticaria) por lo que las reacciones se desconoce si son por el consumo del ingrediente en cuestión o por la falta de medicamentos. Cabe mencionar que el grupo control de estos estudios reaccionan igual a aquellos consumiendo diferentes concentraciones del aditivo en estudio, por lo que la toxicidad de los colorantes aún es un misterio y el objeto de diferentes estudios con el fin de aclarar la situación de las personas afectadas por los mismos. (10)

A pesar de los diferentes estudios existe la teoría de que la toxicidad de los colorantes radica, principalmente, en la absorción del mismo por parte de los tejidos hepáticos de quienes lo consumen. (4a)

Algo importante de resaltar es que los colorantes cancerígenos son poco polares, solubles en grasas, y atraviesan con cierta facilidad la barrera intestinal, incorporándose al organismo. La mayoría de los colorantes no permitidos tienen este mecanismo. (4a)

#### **D. Métodos para la determinación de colorantes en alimentos**

Actualmente existe una gran diversidad de métodos para la cualificación de colorantes sintéticos en los diferentes alimentos los cuales se basan en la separación de los otros ingredientes y luego la aplicación de una cromatografía, a la fase acuosa, para la separación de los diferentes colorantes que puedan encontrarse en cada alimento. (8)

Sin embargo, ante el aumento en el uso de colorantes artificiales en diferentes alimentos y medicamentos se ve la necesidad de encontrar métodos adecuados en los cuales se pueda realizar una cuantificación de los mismos con una recuperación aceptable para que sea posible aplicar las diferentes normativas existentes en cuanto al tema. (8)

Dentro de los métodos de cuantificación de colorantes se encuentra uno desarrollado por S. Chou, Y.-H. Lin, C.-C. Cheng, D.-F. Hwang el cual se basa en una cromatografía electrocinética capilar en la cual reportan un 82% de recuperación de los diferentes colorantes. Sin embargo el Dr. Meeenakshi Tripathi desarrolló un método con cromatografía en papel y espectrofotometría que reporta 96% de recuperación para la tartrazina. Este es el método que se utilizará durante este proyecto, para comprobar los porcentajes de recuperación y validarlo de forma que pueda ser utilizado como una herramienta en la aplicación de la norma correspondiente. (11)(3 a)

Lastimosamente no han sido desarrollados más métodos para la cuantificación de colorantes, debido a la baja cantidad de estos aditivos en comparación con el resto de ingredientes de los alimentos, sin embargo es un tema que cada vez cobra más importancia por lo que se ha vuelto objeto de estudio.

## E. Tartrazina: características, aplicaciones industriales y análisis de Laboratorio

Su uso está autorizado en más de sesenta países, incluyendo Estados Unidos. Es un colorante ampliamente utilizado. A nivel anecdótico, la tartrazina es el colorante del condimento para paellas utilizado en sustitución del azafrán. La tartrazina es capaz de producir reacciones adversas en un pequeño porcentaje (alrededor del 10%) de entre las personas alérgicas a la misma. El mecanismo de esta sensibilidad no es bien conocido. Se ha acusado a la tartrazina de producir trastornos en el comportamiento de los niños, acusación que no se ha terminado de estudiar. (7)

1. Características: La tartrazina pertenece a un grupo de colorantes conocido como colorantes azoicos los cuales deben su color a la presencia de un grupo azo



conjugados con anillos aromáticos por ambos extremos. (9)

Como en el caso de los demás colorantes artificiales, los colorantes azoicos autorizados para su utilización como aditivos alimentarios son todos solubles en agua, debido a la presencia de grupos sulfónicos.

Las características químicas de la tartrazina son:

- Fórmula química de la tartrazina e sal trisódica de 5-oxo-1(*p*-sulfofenil)—4-[(*p*-sulfofenil)azo]-2-pirazolina-3-ácido carboxílico.
- Fórmula empírica:  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}_3$
- Peso molecular: 534.36 g/mol
- Absorbancia: a un pH de 7 tiene un A de 1.4 a una onda de 425nm
- Números de identificación:
  - Cas Reg. No. 1934-21-0
  - UE: E-102

(9)

2. Aplicaciones industriales: La tartrazina es un colorante ampliamente utilizado (desde 1916), en productos de repostería, derivados cárnicos, sopas preparadas, conservas vegetales, salsas, helados, postres, caramelos y otras golosinas. También se utiliza para colorear las bebidas refrescantes de "naranja" y "limón". La toxicidad aguda de la tartrazina es muy pequeña, incluso menos que la de sal común. (8)

La “ingestión diaria aceptable”, prácticamente imposible de alcanzar está establecida en 7,5 mg/kg de peso. Sin embargo, parece que la tartrazina es capaz de producir reacciones adversas en un pequeño porcentaje (alrededor del 10%) de entre las personas que son alérgicas a la aspirina. El mecanismo de esta sensibilidad cruzada no es bien conocido, ya que no existe un parentesco químico evidente entre ambas sustancias. (8)

3. Análisis de laboratorio: A la tartrazina se le pueden realizar diferentes análisis de laboratorio para asegurar tanto la calidad del mismo como la pureza del colorante. Entre las pruebas a realizar a la tartrazina en laboratorios se encuentran:

- Solubilidad en agua, con lo que también se puede medir la materia insoluble en agua (no más de 0.2%)
- Espectrofotometría, en espectro visible
- Cromatografía: puede ser de columna o de capa fina, esto con el fin de determinar que no hayan impurezas en la muestra que se está analizando (9)

4. Toxicidad de la tartrazina: Este es un colorante altamente relacionado con hiperactividad en niños. Después de varios análisis y estudios se pueden mencionar algunos resultados que son de importancia industrial. A pesar que no se encontró un efecto dañino a largo plazo como lo sería el desarrollo de un cáncer, si se ha encontrado que la tartrazina tiene efectos inmunosupresores, también es causante de migrañas, eczema y visión borrosa, por lo que es eliminada de la dieta de personas alérgicas a la misma o con padecimientos crónicos como el asma o alergias riníticas. Es importante mencionar que todos los estudios que existen en cuento a la toxicidad de la tartrazina son realizados en ratones de laboratorio, y que en la mayoría de estos no se ha encontrado una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo que está consumiendo altas cantidades de colorante. (10)

## **F. Normativas de los colorantes**

Existen diferentes normas a nivel mundial que pueden ser consultadas para conocer sobre la toxicidad del colorante así como la ingesta diaria admisible, en esta sección se mencionarán algunas así como los niveles de colorantes admisibles según estas normas, de modo que se pueda obtener una idea a la cantidad de estos colorantes que debieran de ser encontrados en los análisis a realizar y como debieran estar los productos en el país.

### **1. Unión Europea: Las principales regulaciones vigentes en la Unión Europea (UE) respecto al uso de los colorantes son:**

- La Directiva de Consejo 94/36/EC del Parlamento Europeo, la cual se refiere al uso de los colorantes en los productos alimentarios, y
- La Directiva de la Comisión 95/45/EC, la cual especifica los criterios de pureza que deben cumplir éstos.

Estas regulaciones han sido implementadas en varios de los Estados Miembros, y están encargadas de definir una lista de los colorantes permitidos que satisfagan el criterio específico de pureza. A nivel de la UE, todos los colorantes aprobados para su uso han sido evaluados por el Comité Científico de Alimentos. Para la evaluación de un colorante alimentario, el comité define un valor de Ingesta Diaria Admisible (IDA). Sólo aquellos colorantes que hayan sido evaluados por medio de esta forma, reciben un número E, y esto indica su aprobación europea.

**2. FDA:** La normativa del FDA divide los colorantes entre los permitidos para comida humana, farmacéutica y cosméticos, estos están indicados en una lista aprobada la cual se encuentra en el Código Federal de Regulaciones (Code of Federal Regulations) en las partes 73 y 74 del mismo. Los colorantes permitidos para uso humano se encuentran en las partes 73 subparte A y parte 74 subparte A. Estos están divididos, debido a que uno de los grupos indica que el colorante está o no exento de una certificación por batch. (2)

3. CODEX: La norma codex que puede ser utilizada para los colorantes es la norma CODEX STAN 192 195 Norma General para aditivos alimentarios, en la cual se listan los aditivos seguros así como el uso y las cantidades permitidas para cada uno de los mismos. (1)

4. COGUANOR: En la lista de normas COGUANOR se encuentran varias que se refieren a los colorantes artificiales como lo son: NGO 34 147 h2 hasta la norma NGO 34 147 h15. Todas estas normas son especiales para determinar la pureza y composición de los colorantes usados, no para determinar la cantidad a utilizar en cada uno de los diferentes alimentos. También está la norma NGO 34 148. (3)

#### **G. Refrescos líquidos sintéticos**

1. Características: Los refrescos sintéticos son aquellos que se consiguen por una mezcla de ingredientes. Hay diferentes clasificaciones para los mismos que se centran principalmente en la cantidad de azúcar que estos contienen. Están los azucarados y semiazucarados. Como principal característica se tiene su alta solubilidad en agua, así como de un moderado a bajo contenido calórico. Se tiene una gran variedad de presentaciones así como de sabores en el mercado. (6b)

2. Ingredientes: Los refrescos en polvo están compuestos principalmente por azúcar. Los demás ingredientes son: ácido cítrico (como acidulante), saborizante (puede ser artificial o pulpa de fruta deshidratada), fosfato tricálcico y/o dióxido de silicio (como antihumectantes) gomas (como estabilizantes) edulcorantes artificiales y colorantes. (6b)

3. Producción de los mismos: La producción de este tipo de producto es sumamente sencilla. Debido a que todos los ingredientes necesarios para la fabricación de los mismos se encuentran en presentación de polvo, el procedimiento es una mezcla y homogenización de una mezcla de polvos. (6b)

Solamente en el caso que se utilice pulpa de fruta fresca se deberá utilizar un proceso de deshidratado antes de poder mezclarlo con los demás ingredientes.

4. Normas involucradas:

**a. FDA:** Indica los ingredientes y los límites que estos deben de tener para poder ser consumidos por seres humanos. Norma 21 USC 343 (r) (6). (2)

**b. CODEX:** Este sistema no tiene normas específicas para la elaboración de refrescos en polvo, sin embargo presenta normas para los aditivos que estos pueden llevar (CODEX STAN 192 1995 Norma General para aditivos alimentarios referido como alimento tipo 14.1.4.3) así como el azúcar como materia prima. (1)

**c. COGUANOR:** Para las bebidas en polvo COGUANOR tiene la norma NGO 34 187 para Bebidas en polvo.

Especificaciones. Esta es la norma con la que todo productor que comercialice este tipo de producto en el país debe guiarse. (3)

## H. Espectrofotometría

Un espectrofotómetro es un dispositivo que posee una fuente de radiación que se puede dirigir hacia una muestra que se espera absorba parte de esa radiación, la cual se puede detectar mediante un circuito que produzca una señal reproducible. La determinación cuantitativa de una especie, con base en observaciones que dependan de la cantidad de radiación absorbida dependen de la comparación entre el valor de la absorción de un patrón de referencia y la absorción de la muestra. Los espectrofotómetros deben permitir efectuar la comparación entre la señal obtenida por una mezcla que no contiene el analito y otra que si lo tiene para poder tener la señal de esa diferencia.

1. Absorbancia: La absorbancia A de una solución se define mediante la ecuación:

$$A = -\log T$$

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Nuestro país se encuentra en vías de desarrollo, sin embargo la implementación inminente del Tratado de Libre Comercio con la región centroamericana y Estados Unidos, representa para la industria tener que apegarse a normas internacionales que antes no eran tomadas en cuenta.

Los colorantes artificiales con los que la industria elabora sus productos, son sustancias que en otros países son controlados en su uso, debido a su efecto alergénico, hepatotóxico y cancerígeno, a determinadas concentraciones en grupos poblacionales sensibilizados. Son colorantes que, en especial, se utilizan en alimentos dirigidos a niños, de manera que el producto sea más llamativo para el consumidor.

En el país no se evalúa de rutina la concentración del tartrazina en los alimentos, por lo cual se desconoce la concentración utilizada de dicho colorante, por la industria de bebidas y refrescos sintéticos listos para consumir. Es por ello que este proyecto no sólo es de interés en salud pública debido a las alergias y otros efectos colaterales reportados en la literatura provocado por el abuso de dicho colorante, sino que es de interés tecnológico, pues puede proveer un método confiable y práctico con el cual puede satisfacer a las exigencias del mercado, así como apoyar a la industria para que pueda cumplir con normas internacionales.

## V. METODOLOGÍA

Se realizará el método el cual consta de: una muestra de 1 a 2 gramos del producto en cuestión en el cual se encontrarán los diferentes colorantes. La muestra será diluida en 15ml de agua y se agregarán 10 gotas de ácido acético glacial, esta solución se pone a hervir con un segmento de 50mg de lana. Luego la lana será tratada con 10 gotas de amonio concentrado y 5ml de agua para eluir el color de la lana. Este eluido será evaporado para tener un residuo seco que luego de disolverlo en un volumen de alcohol al 60% se utilizará en cromatografía de papel usando acetato de sodio-amonio-agua (2:5:95) (p/v/v) como fase móvil. Los puntos de color del papel serán recolectados y diluídos en etanol al 60% para poder leer la absorbancia al  $\lambda$  respectivo (425 para la tartrazina) según el estándar adecuado.

Durante el proceso se realizará un continuo examen crítico para verificar la funcionalidad del método que se está realizando. Al momento de ocurrir una alteración o que el método no esté funcionando de la manera en que se espera se realizarán modificaciones que se crean necesarias para continuar con el proyecto y mejorar los resultados obtenidos. En la última sección de la etapa de desarrollo se evaluará la incidencia de las modificaciones realizadas durante el proceso.

De comprobarse la funcionalidad del método, serán evaluadas 100 muestras de refrescos vendidos en la ciudad de Guatemala, para determinar las concentraciones de tartrazina utilizadas por los fabricantes.

Finalmente se realizarán recomendaciones sobre el contenido adecuado del colorante en las diferentes matrices para que estos no causen ningún tipo de reacción en el consumidor.

### **Materiales y equipo a utilizar:**

- 4 litros ácido acético glacial
- 4 litros de hidróxido de amonio 26%
- 12 litros etanol 95%
- 10 pliegos papel filtro Whatman No. 1
- 500 gramos acetato de sodio
- 3 perillas de 3 vías
- Espectrofotómetro Lamda

## **VI. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **A. Unidad experimental (factor bajo estudio)**

El estudio se realizará sobre el colorante Tartrazina (amarillo #5), se cuantificará dicho colorante por medio de espectrofotometría. Se medirá la longitud de onda máxima a la cual absorbe la Tartrazina y luego una curva de calibración a dicha longitud para luego determinar la concentración en una muestra analizada.

### **B. Tamaño de muestra y número de repeticiones**

Se utilizarán muestras de 15mL en las diferentes partes del estudio. Para la realización del barrido se utilizará una concentración conocida de 20ppm en una solución de etanol 60%. La curva de calibración será realizada con 8 concentraciones conocidas con tres repeticiones para luego obtener un promedio. Para la validación del método se utilizarán 8 concentraciones diferentes de estándar, se realizarán 10 repeticiones de cada concentración, de modo de obtener un porcentaje de recuperación del colorante luego del tratamiento respectivo. Luego se analizarán 100 muestras de refrescos artificiales que hay en el mercado para corroborar si estos se encuentran o no dentro del límite permitido el cual es de 100ppm.

### **C. Análisis estadístico**

Para las diferentes etapas del proyecto se utilizarán diferentes herramientas estadísticas. Para obtener los diferentes datos se usaran medias y desviaciones estándar. Se utilizará una regresión para encontrar la ecuación adecuada para la absorbancia que corresponde a cada concentración utilizada.

## VII. CÁLCULOS

Se realizaron diferentes cálculos para determinar la media de los datos, la desviación estándar así como el coeficiente de correlación.

### **Media aritmética:**

Esta es una medida estadística que indica un valor promedio de un grupo de datos determinado. Está dado por la siguiente ecuación:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i}{n} = \frac{a_1 + \dots + a_n}{n}$$

### **Desviación estándar:**

Esta es una medida estadística que indica un valor promedio de las desviaciones que se presentan en un grupo de datos determinado. Está dado por la siguiente ecuación:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

### **Coefficiente de correlación:**

Esta es una medida estadística que establece una medida del grado de asociación lineal en un grupo de datos determinado. Está dado por la siguiente ecuación:

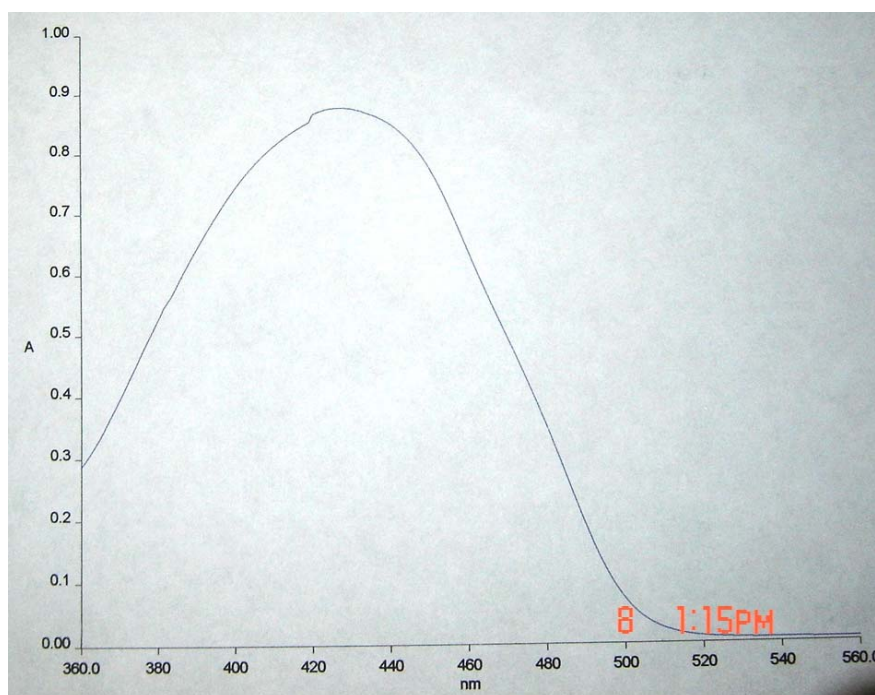
$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

**Verificándose que  $-1 \leq R \leq 1$**

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se tienen resultados para varios procesos realizados. Como primera parte del trabajo se realizó un barrido en un espectro de 360nm a 560nm con una solución de 20ppm de tartrazina en una solución de alcohol al 60% con un pH de 7, con esto se esperaba encontrar la longitud de onda máxima de modo que las demás lecturas, pudiesen ser realizadas a esta longitud de onda.

Gráfica No. 1



Se determinó que la longitud de onda máxima se encontraba a 425nm, por lo que fue la longitud de onda utilizada durante el todo el desarrollo del proyecto.

Con la longitud de onda determinada se procedió a buscar concentraciones adecuadas para la lectura de una curva de calibración lineal. Se inició con 8 concentraciones, las cuales fueron: 0.5ppm, 1ppm, 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm, 150ppm y 200ppm. Las primera dos concentraciones eran para verificar que las bajas concentraciones, podían ser leídas por el aparato y poder comprobar la sensibilidad del método. Las concentraciones de 100ppm, 150ppm y 200ppm fueron escogidas, pues el límite por norma es de 100ppm, por lo que era importante conocer los valores de estos datos.

Sin embargo después de diversas pruebas, se encontró que las concentraciones altas, no eran leídas por el aparato por lo que se probaron concentraciones más bajas, para identificar el punto en el que los resultados no variaban significativamente y en el que se obtenían mejores coeficientes de correlación. En la siguiente tabla se puede apreciar, cómo se midieron diferentes concentraciones y los resultados que éstas significaban.

Tabla 1

Concentración	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media	Desviación estándar
0.5	0.0235	0.0227	0.0283	0.0276	0.0211	0.0225	0.0246	0.0032
1	0.0752	0.0473	0.0601	0.0605	0.0487	0.0475	0.0584	0.0113
10	0.4308	0.4813	0.4696	0.4877	0.4671	0.4466	0.4673	0.0221
20	0.8891	0.9790	0.9400	0.9802	0.9034	0.8865	0.9383	0.0420
30					1.3500	1.3679	1.3500	0.0127
50	2.1607	2.4069	2.4131	2.7704	2.3779	2.1047	2.4258	0.2190
60			2.6734	2.8770	2.7479	2.2383	2.7661	0.1030
70		6.0000	3.0547	3.3139			4.1229	1.6308
80			3.3440	2.7131			3.0286	0.4461
90			3.5754	2.9109			3.2432	0.4699
100	2.7970	6.0000	3.3611	2.5160			3.6685	1.5935
150	6.0000	6.0000					6.0000	0.0000
200	6.0000						6.0000	
Coefficiente de correlación	0.9776	0.8998	0.9564	0.9576	<b>0.9973</b>	<b>0.9941</b>		

Como se puede apreciar en la tabla, el grupo de concentraciones 0.5ppm, 1ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm y 60ppm tienen un alto coeficiente de correlación así como desviaciones estándar bajas por lo que fueron estas las concentraciones que se utilizaron para continuar con el trabajo de tesis.

Luego de haber determinado las concentraciones con las cuales de trabajaría, se obtuvo una curva de calibración en triplicado, para asegurar que los datos obtenidos anteriormente no variarían significativamente durante el proceso.

Tabla 2

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>	<b>Media</b>
0.5	0.0225	0.0235	0.0275	0.0245
1	0.0475	0.0489	0.0493	0.0486
10	0.4466	0.4733	0.4723	0.4641
20	0.8865	0.9221	0.9315	0.9133
30	1.3679	1.4422	1.4190	1.4097
50	2.1047	2.3276	2.6316	2.3547
60	2.2383	2.2383	2.7756	2.4174
<b>Coefficiente de correlación</b>	0.9938	0.9976	0.9933	0.9949
<b>pendiente</b>	0.0390	0.0406	0.0487	0.0427

Debido a que se comprobó que los coeficientes de correlación seguían próximos a 1 se confirmaron las concentraciones y se prosiguió con el trabajo. Sin embargo debido a la gran cantidad de reactivos que se estaban utilizando para la elaboración de las diferentes concentraciones, se procedió a guardarlas en frascos color ámbar en un lugar oscuro para evitar la variación del color. Para controlar esto se realizó una curva de la cinética del colorante con una concentración de 10ppm la cual fue guardada y leída durante un mes para registrar los cambios que esta podía presentar.

Como puede observarse en la tabla 1 y gráfica 1 de anexos los valores oscilan entre 0.47 hasta 0.5 lo cual se concluyó que no era una variación significativa para el proyecto, sin embargo por precaución las muestras no eran guardadas por más de 10 días.

Luego se procedió a realizar el método completo con concentraciones estándar conocidas. Durante la primera parte se encontró que había una pérdida considerable, por lo que se dividió el proceso en dos.

Se observó que los pasos de elusión del color de la lana en la que se había fijado así como el paso de cromatografía eran las más problemáticas, por lo que se midió la absorbancia luego de estos dos pasos. Como se puede ver en la siguiente tabla, el porcentaje de recuperación luego del paso de la elusión de la lana es alto, por lo que se consideró no significativo.

Sin embargo, si se observa los resultados obtenidos, el porcentaje de recuperación es bajo, por lo que se decidió que el paso de cromatografía debía ser revisado meticulosamente para encontrar la forma de aumentar el porcentaje de recuperación.

Tabla 3

**% de Recuperación después de:**

<b>Concentración</b>	<b>lana</b>	<b>cromatografía</b>
0.5	100.71%	56.02%
1	95.22%	40.99%
10	93.46%	20.96%
20	87.77%	17.73%
30	85.68%	20.46%
50	85.39%	21.69%
60	105.67%	14.41%

La cromatografía en papel, tiene tres partes que pudieron estar afectando la recuperación, por lo que cada uno de ellos fue revisado, modificado y comparado con los primeros resultados. El papel, la fase móvil y el solvente de elusión fueron los tres factores revisados.

Lo primero en ser revisado fue la fase móvil, debido a que esta es la responsable de la separación del color con otros elementos que puedan interferir la lectura, pero esto afectaba la fijación del colorante al papel, lo que hacía más difícil la elusión de este para la lectura. La fase móvil que se había estado utilizando hasta ese momento estaba compuesta por:

Acetato de sodio: amonio: agua (2: 5: 95, w/v/v)

Siendo esta la fase móvil que se utiliza en el Laboratorio Nacional de Salud para colores amarillos. Al ver que la recuperación era baja, como puede verse en la tabla 3, se cambió la fase móvil a una cuya composición es:

Citrato trisódico: amonio: agua (2: 5: 95, w/v/v)

Siendo esta la fase móvil del estudio del doctor Tripathi Meenakshi en la India, estudio base para el presente proyecto de tesis. Sin embargo se encontró, como se puede ver en la tabla 4, que nuevamente la recuperación fue baja a pesar de haber realizado el trabajo en triplicado.

Tabla 4

<b>Concentración</b>	<b>Recuperación 1</b>	<b>Recuperación 2</b>	<b>Recuperación 3</b>	<b>Media</b>	<b>%</b>
0.5	0.00950	0.00810	0.00790	0.00850	36.12
1	0.02420	0.02430	0.02350	0.02400	49.11
10	0.13690	0.13710	0.13750	0.13717	28.98
20	0.38170	0.38050	0.37940	0.38053	41.27
30	0.24540	0.24540	0.24560	0.24547	17.02
50	0.81080	0.81080	0.80960	0.81040	34.82
60	0.47880	0.47480	0.47400	0.47587	7.93

Nuevamente se cambió la fase móvil por una encontrada en la literatura para analizar la pureza de un colorante, esta está compuesta por:

2-butanol: agua: etanol: amonio (600:264:135:6)

Esta fase, presentó una complicación: el colorante no corría de la manera esperada, pues se quedaba cerca del punto de partida. Otro problema fue que el color es muy soluble en esta fase, por lo que el color se dispersaba hacia los lados en el papel, no sólo hacia arriba. Al hacer las repeticiones, se encontró que la fase había tomado un color amarillo propiciando aún más la pérdida del color.

Tabla 5

<b>Concentración</b>	<b>Recuperación 1</b>	<b>Recuperación 2</b>	<b>Media</b>	<b>%</b>
0.5	0.01040	0.01110	0.01075	34.79%
1	0.0087	0.0089	0.00880	18.53%
10	0.0728	0.0725	0.07265	15.70%
20	0.1227	0.1226	0.12265	13.25%
30	0.3623	0.3614	0.36185	26.72%
50	1.0792	1.0782	1.07870	51.00%
60	0.6696	0.6697	0.66965	26.81%

Nuevamente se cambió la fase para intentar lograr un porcentaje de recuperación aceptable. Esta vez se utilizó una conformada por:

2-butanona: agua: acetona: amonio (700: 300: 300: 2)

Esta fase, funcionó de la misma manera que la compuesta con 2-Butanol, pues la muestra de color no corría de manera adecuada en el papel, por lo que la separación con cualquier interferente que pudiese encontrarse en la solución no sería eliminado, sin embargo en esta fase el color no se disolvía en ella.

Tabla 6

<b>Concentración</b>	<b>Recuperación 1</b>	<b>Recuperación 2</b>	<b>Media</b>	<b>%</b>
0.5	0.00220	0.00220	0.00220	13.66%
1	0.0051	0.0050	0.00505	12.87%
10	0.0934	0.0923	0.09285	20.77%
20	0.1817	0.1815	0.18160	20.29%
30	0.3218	0.3215	0.32165	23.61%
50	0.5986	0.5967	0.59765	27.03%
60	0.7716	0.7701	0.77085	26.74%

Se debe aclarar que el porcentaje de cada uno de las fases móviles, está siendo comparado a la curva de calibración de ese día, de forma de tener resultados más exactos. Se buscó ampliamente en la literatura, sobre fases móviles diferentes para la tartrazina, sin embargo la literatura coincidía en las fases que ya habían sido probadas.

El papel fue otro factor estudiado, por la fijación de color al mismo. Luego de leer y consultar se determinó que éste podía ser reemplazado por placas de celulosa, no se utilizaron placas de sílica gel, por recomendación de personas que han trabajado con colorantes en alimentos. Se realizó en duplicado una prueba del color punteado en placas de celulosa en la primera fase móvil mencionada. Luego de dejar correr la fase por la placa esta se retiraba de la cámara y se dejaba secar en la campana de extracción. Luego con una espátula se raspaba cuidadosamente la parte en la que se encontraba el color, esto se colocaba en un beaker y se esperaba a que la celulosa precipitara para poder leerlo en el espectrofotómetro. Sin embargo se encontró que la celulosa es altamente soluble en agua, y al utilizar como solvente alcohol al 60% se tenía una gran interferencia por la celulosa disuelta en el agua del solvente. Aún así la recuperación, a pesar de ser mayor que en el papel en esa fase móvil en un 5%, no es la recuperación que se esperaba y no es posible diferenciar completamente si la lectura proviene de la celulosa o del colorante.

Se puede observar que los mayores porcentajes obtenidos corresponden a las concentraciones bajas, esto se debe a que se raspó un área mayor, pues los límites del punto coloreado no eran tan definidos como aquellos en las concentraciones altas, por lo que se obtuvo una mayor interferencia por parte de la celulosa.

Tabla 7

<b>Concentración</b>	<b>Recuperación 1</b>	<b>Recuperación 2</b>	<b>Media</b>	<b>%</b>
0.5	0.07220	0.13525	0.10373	615.12%
1	0.09385	0.12210	0.10798	277.10%
10	0.40640	0.22530	0.31585	70.95%
20	0.35245	0.28125	0.31685	35.66%
30	0.63270	0.40830	0.52050	38.34%
50	0.94125	0.60960	0.77543	35.20%
60	1.04385	0.50515	0.77450	24.42%

El último factor que fue modificado fue el solvente utilizado para eluir el color de la fase estacionaria. El método del Dr. Tripathi Meenakshi indicaba que este solvente debía ser alcohol al 60%. Sin embargo luego de la consulta a diversas fuentes bibliográficas se constató que también la acetona era utilizada para estos fines, por lo que se intentó utilizar una mezcla acetona: alcohol en las siguientes concentraciones: (75: 25), (50:50) y (25: 75), esto se realizó con una sola concentración para obtener como variable solamente el eluyente. Se utilizó la acetona, ya que posee una mayor polaridad que el alcohol. En este caso se utilizó una concentración de 30ppm, debido a que se puede monitorear la elusión del colorante según el color del solvente. Se encontró que, como en la fase móvil, la acetona no diluía el color, por lo que se obtuvieron mejores resultados con el solvente compuesto por alcohol, como se puede apreciar en la tabla inferior:

Tabla 8

<b>Concentración</b>	<b>Acetona:Alcohol</b>			<b>Calibración</b>
	<b>(25:75)</b>	<b>(50:50)</b>	<b>(75:25)</b>	
30ppm	0.6327	0.1453	0.0060	1.38354242
<b>% de recuperación</b>	45.7%	10.5%	0.4%	

El porcentaje de recuperación en este caso es relativo debido a que por limitaciones del aparato el blanco utilizado fue una solución de acetona: alcohol (50:50) para las tres lecturas.

Luego de realizar las diversas modificaciones anteriormente explicadas, se determinó que el método no tiene una recuperación aceptable. Tampoco cuenta con un factor que pueda ser relacionado a todas las concentraciones, como lo sería un factor de dilución adecuado.

Como puede ser observado en la siguiente tabla, se obtenía un factor de dilución, sin embargo como este varía significativamente de una concentración a otra, este no puede ser aplicado para muestras que contengan concentraciones desconocidas, pues no se sabría cual de todos los factores había que aplicar. Por lo tanto se utilizó la pendiente para con una absorbancia conocida, poder obtener la concentración, pero esto tampoco pudo ser utilizado debido a que no se obtenían valores para nada cercanos a las concentraciones originales.

Tabla 9

<b>Concentración</b>	<b>Calibración</b>	<b>Recuperación</b>	<b>Factor</b>	<b>Concentración usando pendiente</b>
0.5	0.0224	0.0063	3.584	0.160441605
1	0.0462	0.0054	8.556	0.138621547
10	0.4617	0.0058	80.287	0.147606276
20	0.9287	0.0056	165.839	0.143755678
30	1.3700	0.0060	228.333	0.154023941
50	2.2194	0.0102	217.583	0.261840699
60	2.4425	0.0115	212.387	0.295212553
<b>Pendiente</b>	0.0419			
<b>Coef correla</b>	0.9974			

Luego de esto se concluyó que la recuperación del método citado en la literatura (12) no era posible de obtener. Sin embargo se comprobó que, aunque no se obtuvieron las recuperaciones deseadas, el método muestra alta repetibilidad, pues como puede ser en las diversas tablas de anexos los datos son sumamente constantes.

## IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los análisis realizados mostraron que el porcentaje de recuperación para la cuantificación de tartrazina en alimentos, era menor al esperado, aún analizando los diferentes factores que pudieron afectar este dato.
- A pesar de haber consultado diferentes referencias bibliográficas y a personas que trabajan en el área, incluyendo al Dr. Tripathi Meenakshi, inventor del método en el cual se basa este proyecto de tesis, no se encontró una forma de aumentar el porcentaje de recuperación de la tartrazina en soluciones estándares.
- Debido al bajo porcentaje de recuperación, no pudo realizarse la validación de este método como uno de rutina, para el análisis de colorantes en alimentos, de modo que tampoco pudo ser determinado si existe o no abuso de este colorante por parte de las empresas de alimentos que utilizan este color.
- Existen diferentes variantes del método base, sin embargo se determinó que el compuesto por la fase móvil de acetato de sodio: amonio: agua (2: 5: 95, w/v/v), papel y alcohol 60% es el que mejor recuperación reporta.
- Para futuros estudios se aconseja, intentar también con otros colorantes artificiales, en especial aquellos no permitidos por las diferentes normas, esto con el fin de cuantificar colorantes más problemáticos que la tartrazina y que si son utilizados e identificados, de forma cualitativa.
- Se sugiere utilizar cromatografía electrocinética capilar, pues esta es utilizada para separación de proteínas, y en algunos estudios se sugiere su uso para separación de colorantes

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Burdock, George. 1997. *Encyclopedia Food and color Additives*. V. 2, 3<sup>a</sup> ed. New York. 3042 págs
2. CODEX ALIMENTARIUS
  - a. [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp)
3. Comisión Guatemalteca de normas
  - a. <http://www.mineco.gob.gt/mineco/coguanor/2003/normas.html>
4. Department of health and human Services, Food and drug Administration
  - a. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/col-toc.html>
  - b. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-col2.html#ftnote1>
  - c. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/col-prod.html#foods>
  - d. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/sfoodadd.html>
5. Escuela de ecología social
  - a. <http://www.ecologiasocialnqn.org.ar/alimentos2.htm>
6. Koutsogeorgopoulou L. Immunological aspects of the common food colorants, amaranth and tartrazine, National Library of Medicine and the National Institutes of Health.
  - a. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=9467198&query\\_hl=3&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=9467198&query_hl=3&itool=pubmed_docsum)
7. Marmion, Daniel. 1984. *Handbook of US colorants for foods, Drugs and cosmetics*. 2<sup>a</sup> ed. New York. 442 págs
8. Meenakshi, Tripathi. 2004. *A novel method for the determination of synthetic colors in Ice cream samples*. Journal of AOAC International. Vol. 87, No. 3
9. Programa nacional de toxicología
  - a. <http://www.niehs.nih.gov/external/espanol/factsheets/2fsntp.htm>
10. *Specifications for identity and purity of food colors*. 1984. Food and Agricultura Organization of the united nations. Roma. 145 págs.
11. Taylor, Steve; Hefle, Susan. 2001. Food Allergies and Other Food Sensitivities: A publication of The Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition. Food Technology. V. 55, No. 9 Chicago.

## XL ANEXOS

### Cinética de 10ppm

Tabla 1

Concentración 10ppm	02/10/2006	03/10/2006	04/10/2006	09/10/2006	10/10/2006	16/10/2006	17/10/2006	19/10/2006	23/10/2006	24/10/2006	31/10/2006	04/11/2006
	0.4930	0.4716	0.4747	0.4964	0.4977	0.4949	0.489	0.4944	0.50035	0.49705	0.5052	0.50145

Gráfica 1

## Cinética 10ppm 02-10-06

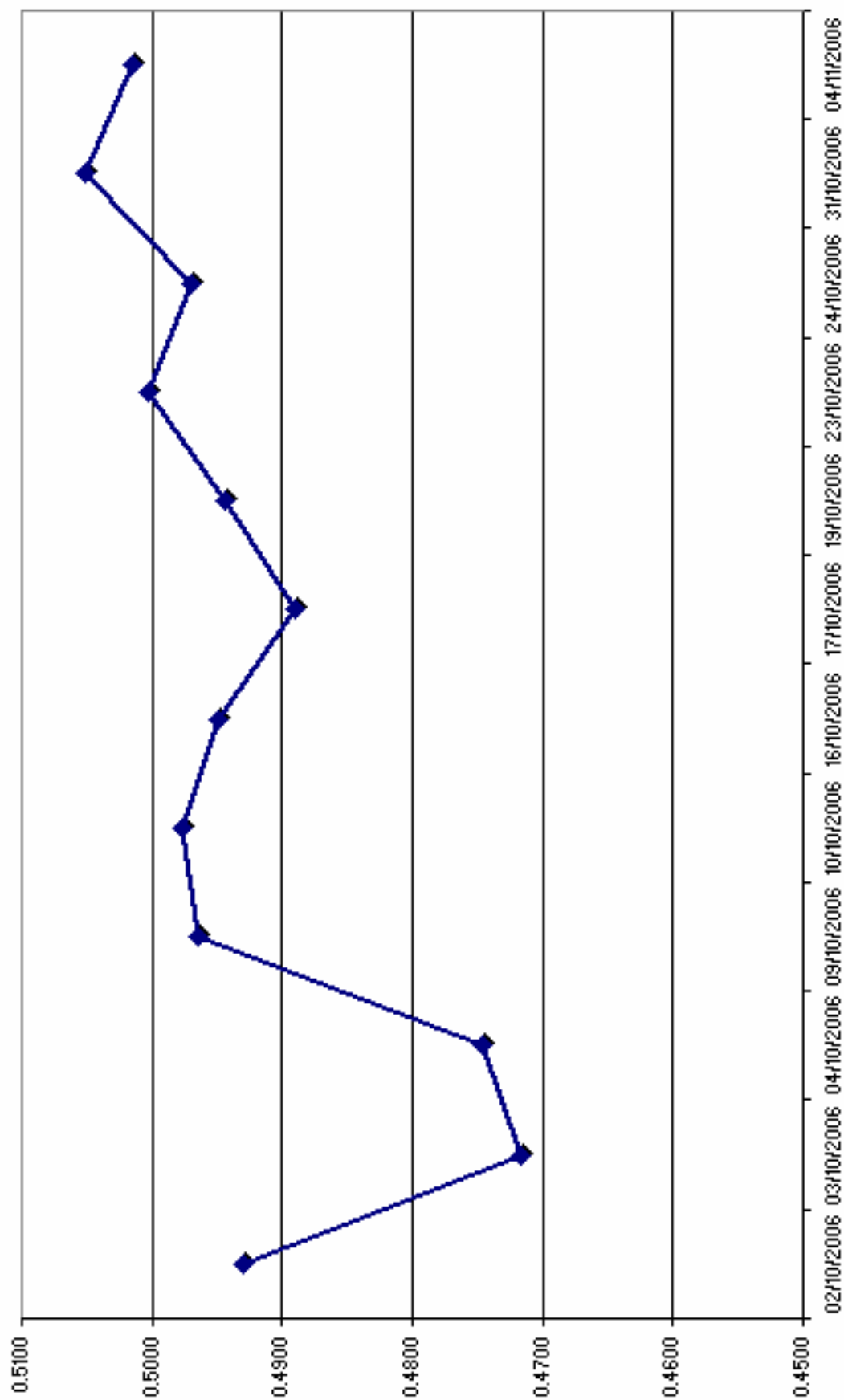


Tabla 2  
Historial de curva de calibración

concentración	04/10/2006	09/10/2006	10/10/2006	16/10/2006	17/10/2006	19/10/2006	23/10/2006	24/10/2006	31/10/2006	04/11/2006	13/11/2006
0.5	0.0225	0.0235	0.0275	0.0238	0.0213	0.0224	0.0237	0.0288	0.03090	0.0173	0.0161
1	0.0475	0.0489	0.0493	0.0473	0.0435	0.0462	0.0481	0.0451	0.04750	0.0388	0.03925
10	0.4466	0.4733	0.4723	0.4617	0.4375	0.4617	0.4664	0.4604	0.46280	0.4419	0.44705
20	0.8865	0.9221	0.9315	0.9303	0.9234	0.9287	0.9424	0.9187	0.92590	0.8804	0.89495
30	1.3679	1.4422	1.4190	1.3832	1.3878	1.3700	1.4433	1.3391	1.35420	1.3500	1.36255
50	2.1047	2.3276	2.6316	2.2235	2.3416	2.2194	2.7894	1.9858	2.11515	2.1902	2.211
60	2.2383	6.0000	2.7756	2.3132	2.6172	2.4425	6.0000	2.1424	2.49805	4.0045	2.88225
<b>Pendiente</b>	0.03895	0.08109	0.04867	0.04057	0.04483	0.04193	0.08467	0.03682	0.04162	0.05872	0.04679
<b>Coef. correla</b>	0.99385	0.90426	0.99396	0.99346	0.99877	0.99741	0.92959	0.99228	0.99906	0.96354	0.99849

Tabla 3  
Datos estadísticos de historial de curva de calibración

concentración	Media	desv est
0.5	0.0234	0.0045
1	0.0456	0.0036
10	0.4392	0.0103
20	0.9168	0.0202
30	1.3835	0.0362
50	2.2854	0.2352
60	3.2649	1.4422

Gráfica 2

**Curva de calibración**

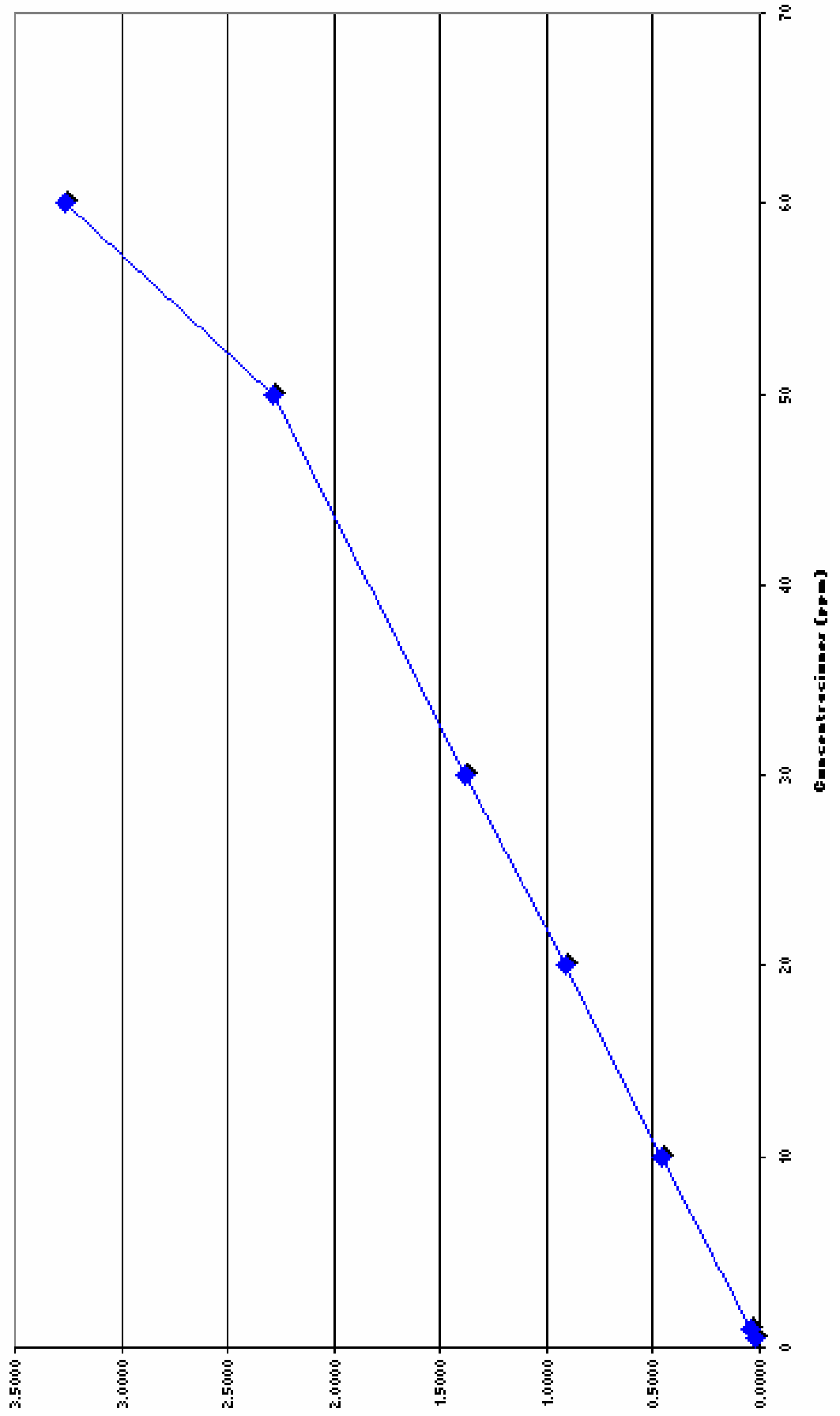


Tabla 4  
Historial de recuperación

concentración	04/10/2006	09/10/2006	10/10/2006	16/10/2006	19/10/2006	23/10/2006	24/10/2006	31/10/2006	04/11/2006	13/11/2006
0.5	0.0085	0.0085	0.0058	0.0090	0.0063	0.0041	0.0063	0.01075	0.0000	0.0722
1	0.0077	0.0240	0.0195	0.0075	0.0054	0.0122	0.0051	0.00880	0.0030	0.0939
10	0.0279	0.1372	0.0942	0.0492	0.0058	0.0318	0.0482	0.07265	0.0896	0.4064
20	0.0755	0.3805	0.1965	0.1468	0.0056	0.0966	0.1128	0.12265	0.1364	0.3525
30	0.1045	0.2455	0.4761	0.2499	0.0060	0.1453	0.3447	0.36185	0.2648	0.6327
50	0.1449	0.8104	0.4928	0.6182	0.0102	0.0788	0.2427	1.07870	0.5384	0.9413
60	0.1461	0.4759	0.4075	0.8903	0.0115	0.1715	0.4305	0.66965	0.4576	1.0439

Tabla 5  
Datos estadísticos de historial de recuperación

concentración	Media	desv est	% recuperación
0.5	0.0131	0.0210	56.02%
1	0.0187	0.0272	40.99%
10	0.0963	0.1155	20.96%
20	0.1626	0.1185	17.73%
30	0.2831	0.1826	20.46%
50	0.4956	0.3728	21.69%
60	0.4704	0.3259	14.41%

Gráfica 3  
Porcentaje de recuperación promedio

