



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



Escuela Técnica  
Superior de  
Ingeniería  
Agronómica

Universidad Politécnica de Cartagena

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas  
Biológicos

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

*Análisis y Estabilidad de Colorantes  
Azules en Bebidas Comerciales*

**Ignacio Catalá López**

Dirigido por:

**José María Obón de Castro**



## Índice

Consideraciones previas .....	1
Abstract.....	2
Resumen .....	4
1.-Introducción .....	6
1.1    Aditivos alimentarios .....	6
1.1.1. Concepto de aditivo alimentario .....	6
1.1 .2.Clasificación de los aditivos alimentarios .....	7
1.1 .3. Exigencias de los aditivos alimentarios.....	8
1.1.4. Legislación.....	9
1.1 .5. Toxicidad y dosis diaria admisible .....	10
1.2    Los colorantes alimentarios en la industria de bebidas .....	12
1.2.1. Colorantes alimentarios.....	12
1.2.2. Colorantes azules.....	17
1.3    Importancia de la industria de bebidas en el mercado alimentario.....	26
1.3.1. Situación mundial del sector de las bebidas.....	27
1.3.2. Situación nacional del sector de las bebidas .....	29
1.3.3. Principales empresas agroalimentarias de bebidas.....	32
2.-Objetivos.....	34
3.-Materiales y métodos.....	35
3.1    Materiales .....	35
3.1.1. Bebidas y colorantes .....	35
3.1.2. Materiales y equipos de laboratorio.....	37
3.2    Métodos.....	41
3.2.1 Medida de pH.....	41
3.2.2 Ensayos de estabilidad en estufas .....	42
3.2.3 Disolución de colorantes.....	42
3.2.4. Métodos de análisis de colorantes: espectrofotometría UV-Visible .....	42
3.2.5. Métodos de análisis de colorantes: Análisis por HPLC .....	44
4.-Resultados y discusiones .....	47
4.1.    Análisis de colorantes alimentarios azules en bebidas comerciales .....	47
4.1.1. HPLC. Cromatografía líquida de alta eficacia en colorantes azules .....	47
4.1.2. Recta de calibrado. ....	53
4.1.3. Análisis por HPLC de bebidas comerciales.....	55



4.2. Estabilidad de colorantes azules en disolución .....	70
4.2.1. Ensayo de estabilidad de bebidas comerciales.....	70
4.2.1. Experimento de estabilidad con bebidas modelo azules.....	91
4.3. Estabilidad de nuevos colorantes azules en bebidas comerciales .....	110
4.3.1. Estabilidad <i>Natural Blue</i> .....	110
4.3.2. Estabilidad <i>Espirulina Blue</i> . ....	113
5.-Conclusiones.....	117
6.-Bibliografía.....	119
Anexo I: IX Congreso Internacional de Química de Anque .....	124
Anexo II: Índice de tablas.....	125
Anexo III: Índice de tablas.....	126



## Consideraciones previas

La información detallada en el trabajo fin de grado fue presentada en un poster en el *IX Congreso Internacional de Química de Anque*, realizado en San Pedro del Pinatar del 17 al 20 de Junio de 2018. El poster cuyo título fue “HPCL Analysis of Blue Colorants in Wines” se puede observar en el **Anexo: IX Congreso Internacional de Química de Anque.**



## Abstract

The blue beverages present in the different distribution channels have become very important over time. This final degree project seeks to demonstrate the stability of the dye used for excellence in such beverages, the E-133 or Brilliant Blue FCF. First of all commercial beverage analysis was carried out to verify the presence of the E-133 dye in its composition, also calculating the present concentration. We studied wines, isotonic drinks, tonic and refreshing drinks with juices. The analyzed drinks presented the labeled dye according to its labeling, and in addition the added concentration was considered viable according to its admissible daily dose. It is worth mentioning that these beverages did not present adulterations of dyes in their composition. Subsequently, the stability of the E-133 dye was evaluated in beverages at different temperatures, thus demonstrating its commercial viability. It should be noted that the aim was to find the reason for the color degradation and the factors that.

Stored at 50°C and in dark conditions the wines changed their blue tones to green after about 17 days, while the isotonic and tonic drinks did not lose their characteristic blue color. The refreshing drinks formulated with fruit juice suffered different degradation of the blue color depending on the fruits present in said beverages.

The stability of blue beverages model at high temperature (80°C) was studied, and at 50°C in the case of the study of wines, and different notable compounds were identified by HPLC, which presented significant areas in their chromatograms at different retention times.

It was concluded that the dye E-133 suffered a low degradation of 15-18.9% after the days of storage at 80 ° C. At 50°C in the wines there was no such degradation. Ultimately, the possibility of replacing this synthetic dye with blue dyes totally natural, such as Spirulina



Blue and Natural Blue, was studied, studying its effect at different pH. Spirulina Blue proved to cause precipitates and a greater turbidity in beverages at pH around 3-4, while Natural Blue caused a shade different from the desired blue at acidic pH. Therefore, it is not possible to commercially use these natural dyes in the beverages studied.



## Resumen

Las bebidas azules presentes en los diferentes canales de distribución han adquirido una gran relevancia con el paso del tiempo. Este trabajo final de grado busca demostrar la estabilidad del colorante usado por excelencia en dichas bebidas, el E-133 o *Azul Brillante FCF*.

En primer lugar se efectuaron análisis de bebidas comerciales para verificar la presencia del colorante E-133 en su composición, calculando también la concentración presente. Se estudiaron vinos, bebidas isotónicas, tónicas y bebidas refrescantes con zumos

Las bebidas analizadas presentaron el colorante marcado según su etiquetado, y además la concentración adicionada se consideró viable según su dosis diaria admisible. Cabe mencionar que estas bebidas no presentaron adulteraciones de colorantes en su composición.

Posteriormente se valoró la estabilidad del colorante E-133 en las bebidas a diferentes temperaturas, demostrando de esta manera su viabilidad comercial. Cabe destacar que se trató de buscar la razón de la degradación del color y los factores que favorecían dicho proceso.

Almacenados a 50°C y en condiciones de oscuridad los vinos cambiaron su tonalidad azul a verde transcurridos unos 17 días, mientras que las bebidas isotónicas y las tónicas no perdieron su color azul característico. Las bebidas refrescantes formuladas con zumo de frutas sufrieron diferente degradación del color azul dependiendo de las frutas presentes en dichas bebidas.

Se estudió la estabilidad de bebidas azules modelo a alta temperatura (80°C), y a 50°C en el caso del estudio de los vinos, y se identificaron diferentes compuestos destacables



mediante el HPLC, que presentaron áreas significativas en sus cromatogramas a diferentes tiempos de retención.

Se concluyó que el colorante E-133 sufrió una baja degradación del 15-18,9% tras los días de almacenamiento a 80°C. A 50°C en los vinos no hubo tal degradación.

En última instancia se comprobó la posibilidad de sustituir este colorante sintético por colorantes azules totalmente naturales, como fueron *Espirulina Blue* y *Natural Blue*, estudiando su efecto a diferentes pH.

La *Espirulina Blue* demostró provocar precipitados y una mayor turbidez en las bebidas a pH en torno a 3-4, mientras que *Natural Blue* provocaba una tonalidad diferente al azul deseado a pH ácidos.

Por tanto, no es posible usar comercialmente estos colorantes naturales en las bebidas estudiadas.



## 1.-Introducción

### 1.1 Aditivos alimentarios

#### 1.1.1. Concepto de aditivo alimentario

Los aditivos alimentarios se empezaron a utilizar para satisfacer las necesidades del hombre, ya sea para mejorar las propiedades organolépticas del alimento o incluso para alargar su vida útil. Los primeros aditivos que cumplieron con dichos objetivos fueron; la sal y el vinagre, que mejoraron la conservación de los productos, y el azafrán y la cochinilla que otorgaron unos sabores más apetecibles a los alimentos.

Gracias a los avances experimentados por la química en el siglo XVIII y con las nuevas necesidades de la industria agroalimentaria del siglo XIX, fueron surgiendo diferentes tipos de aditivos alimentarios. [1]

Según el Codex Alimentarius; *aditivo alimentario es cualquier sustancia que por sí misma no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo y cuya adición al alimento en sus fases de producción, fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte directa o indirectamente por sí o sus subproductos, un componente del alimento o bien afecte a sus características.* [2]



### 1.1 .2. Clasificación de los aditivos alimentarios

Según la función que desempeñen los aditivos alimentarios en el propio producto, podemos diferenciar unos aditivos de otros. Es por esto por lo que se establece la siguiente clasificación:

- Aditivos alimentarios que modifican las propiedades organolépticas del producto: en este grupo podemos distinguir los aditivos que influyen sobre el color del producto como podrían ser los colorantes, fijadores del color y decolorantes o blanqueadores, los que influyen sobre el sabor del producto como es el caso de los potenciadores del sabor o los edulcorantes, y los que influyen en el sabor y aroma, como por ejemplo los principios activos aromáticos naturales, concentrados aromáticos naturales y sustancias aromáticas naturales y sintéticas.
- Aditivos alimentarios estabilizadores de las características físicas: dentro de este grupo nos encontramos con los estabilizadores de los sistemas dispersos, ejemplo de ello son los emulgentes, espesantes, gelificantes, antiespumantes y espumígenos, también nos encontramos con estabilizadores de la textura. En este subgrupo destacan antiapelmazantes, antiaglutinantes, endurecedores, humectantes, anticristalizantes, ablandadores, diluyentes, excipientes y bases masticadoras. Un último subgrupo dentro de este tipo de aditivos serían los reguladores de pH, como son los acidulantes y alcalinizantes.
- Aditivos alimentarios inhibidores de alteraciones: estos tipos de aditivos pueden inhibir o bien reacciones biológicas gracias a la acción de conservantes naturales y/o artificiales, o bien reacciones químicas debido a la actuación de antioxidantes y sustancias sinérgicas de los antioxidantes.



- Aditivos alimentarios correctores de los alimentos: este tipo de aditivos son más específicos, ya que su actuación se centra en determinados productos, como es el caso de los aditivos utilizados en la panificación, que utilizan complementos panarios, coadyugantes de la panificación, mejoradores de la levadura e incluso gasificantes para panes especiales. Otro caso de aditivos correctores de alimentos serían los correctores de la vinificación, distinguiendo los correctores del mosto y del vino, y un último ejemplo de este tipo de aditivos sería los encargados de la regulación de la maduración ya sea de productos cárnicos, productos lácteos o incluso de la propia panificación. [3]

### 1.1 .3. Exigencias de los aditivos alimentarios

El correcto uso de los aditivos alimentarios viene especificado en la Norma General para los Aditivos Alimentarios CODEX STAN 192-1995. Todos los aditivos alimentarios incluidos en esta norma, deben de cumplir las siguientes exigencias:

- Inocuidad. Los aditivos no deben presentar riesgos apreciables para la salud de los consumidores en las dosis de uso propuestas. Cuando el alimento vaya destinado a grupos especiales de consumidores (por ejemplo diabéticos, personas con regímenes alimenticios médicos especiales, personas enfermas con regímenes alimenticios líquidos), se tendrá en cuenta la ingestión diaria del aditivo por esos consumidores.

La cantidad de aditivo que se añada a un alimento será igual o inferior a la dosis máxima de uso y constituirá la dosis mínima necesaria para lograr el efecto técnico previsto.



- Justificación de uso. El uso de aditivos en alimentos queda justificado, si estos ofrecen alguna ventaja en el producto final, si no presentan riesgos apreciables para la salud de los consumidores, y si cumplen una o más de las funciones tecnológicas establecidas por el Codex. También se justifica su uso si conserva la calidad nutricional del alimento, si proporcionan los ingredientes o constituyentes necesarios para los alimentos fabricados para grupos de consumidores que tienen necesidades dietéticas especiales, si aumentan la calidad de conservación o la estabilidad de un alimento o mejoran sus propiedades organolépticas, o incluso si proporcionan ayuda en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento del alimento.
- Buenas prácticas de fabricación. Dentro de estas prácticas consideramos que la adición del aditivo en el alimento se adapte a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado, también la necesidad de reducir considerablemente la cantidad de aditivo que pasa a formar parte del alimento como consecuencia del proceso productivo y que no tenga por objeto obtener ningún efecto físico o técnico en el alimento. Cabe destacar que el alimento deberá presentar una calidad excepcional y se preparará y se manipulará al igual que un ingrediente alimentario.[4]

#### 1.1.4. Legislación

En el Reglamento (CE) N 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, se establecen una serie de normas sobre los aditivos usados en los alimentos con el fin de asegurar el funcionamiento eficaz del mercado interior y un elevado nivel de protección de los



consumidores, incluida la protección de los intereses de estos y las prácticas leales de comercio de productos alimenticios, teniendo en cuenta, la protección del medio ambiente.

Este reglamento ofrece listas de aditivos que se pueden utilizar en la industria agroalimentaria, los cuales se reflejan en los anexos de dicha norma. Presenta las condiciones de utilización de dichos aditivos en los alimentos y su etiquetado en el caso de que se vendan los aditivos sin llegar a ser incorporados a los alimentos.

El ámbito de este reglamento se extiende a todos los aditivos alimentarios, aunque no contempla coadyuvantes tecnológicos, sustancias para la protección de plantas y productos vegetales, sustancias añadidas como nutrientes a los alimentos, sustancias utilizadas para el tratamiento del agua, diversos aromas ni enzimas alimentarias.

El Reglamento (CE) N 1333/2008 también recoge los niveles de uso de los aditivos en los alimentos según el valor mínimo para lograr el efecto deseado en el producto final, y teniendo en cuenta la ingesta diaria admisible (IDA) y si el alimento va destinado a personas con necesidades alimenticias específicas.

En el caso de que no se especifique la cantidad de aditivo necesario para el alimento, este se añadirá según el principio de “quantum satis”. Este principio viene a decir: “añade cuanto sea necesario de un ingrediente para que sea alcanzado el efecto deseado, pero no se añada más si se considera demasiado”. [5]

#### **1.1 .5. Toxicidad y dosis diaria admisible**

Los estudios toxicológicos sobre los aditivos alimentarios han permitido establecer cantidades a partir de las cuales se considera que la ingestión del aditivo en cuestión no



tiene efectos nocivos sobre la salud del consumidor. Esta cantidad se denomina ingestión diaria admisible (IDA) o dosis diaria admisible (DDA) y se expresa en mg de sustancia ingerida por día y por Kg de peso corporal, ya que cuanto mayor sea el organismo tanto mayor será la posibilidad de dilución de la sustancia potencialmente nociva, así como la capacidad para destruirla o expulsarla.

La dosis diaria admisible de los aditivos alimentarios es establecida por organismos internacionales, como es el caso de Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives (JECFA) y el Comité Científico de la Alimentación Humana de la CEE. La DDA se determina a partir de la dosis sin efectos “adversos” en el animal, a la que se le aplica previamente un factor de seguridad y equivaldría a la ingesta diaria admisible (IDA) en el consumidor.

Las legislaciones de cada país fijan a su vez la concentración máxima de un aditivo que puede utilizarse en diferentes aplicaciones. Los criterios para el establecimiento de esta cifra dependen del aditivo y del alimento, y se basan en algunos casos en la defensa de la salud del consumidor, pero en otros, en los que el uso de una cantidad mayor tampoco resultaría nocivo, en la prevención de fraudes al consumidor por enmascaramiento de una calidad deficiente, retención excesiva de agua, etc.

Las pruebas toxicológicas realizadas sobre un determinado aditivo, comprenden; la acción instantánea sobre el animal de experimentación (toxicidad aguda), el efecto del aditivo en el crecimiento, comportamiento y mortalidad del animal (toxicidad a corto plazo) y la acción cancerígena de dicho aditivo en el animal (toxicidad a largo plazo). [6]



## 1.2 Los colorantes alimentarios en la industria de bebidas

### 1.2.1. Colorantes alimentarios

#### 1.2.1.1. Concepto de colorante alimentario

Una de las principales propiedades organolépticas de un producto percibida principalmente por el consumidor es su color. Este color característico puede provenir del propio producto, es decir, su color sería totalmente natural, o ser añadido intencionadamente como aditivo alimentario para provocar el cambio de tonalidad deseada. No todos los colorantes alimentarios añadidos a los productos son adecuados con fines alimentarios, ya que algunos pueden resultar perjudiciales para la salud. Como por ejemplo los derivados de cobre, plomo y arsénico, que se usaron en el siglo XIX para colorear los alimentos. Inicialmente se sustituyeron los colorantes naturales por los sintéticos, por ser inestables con el tiempo. Aunque, actualmente se recurren a colorantes naturales en lugar de sintéticos, ya que existe una presión importante por parte de los consumidores.

Los colorantes son aquellas sustancias que añaden o devuelven color a un alimento e incluyen componentes naturales de sustancias alimenticias y otras fuentes naturales que no son normalmente consumidos como alimentos por sí mismos y no son habitualmente utilizados como ingredientes característicos en alimentación. Según la identificación de los aditivos alimentarios establecida por la Unión Europea, los colorantes se denominan como E-1XX. [1]



### *1.2.1.2. Tipos de colorantes*

Podemos diferenciar dos tipos principales de colorantes; los naturales y los sintéticos.

- Colorantes naturales: solo se consideraría como color natural, el color que un alimento tiene por sí mismo. El colorante alimentario de origen natural que se incorpora se suele obtener de materiales biológicos no alimentarios, como sería el caso de plantas o incluso insectos, aunque también se puede obtener de forma espontánea al calentar un alimento como ocurre con el caramelo.

Los colorantes naturales se consideran inocuos con lo cual sus efectos en el organismo son menores, por esta razón se permite un mayor consumo diario de este tipo de colorantes.

Algunos ejemplos de colorantes naturales serían las clorofilas, que provienen de las algas y otorgan un color característico verde, o incluso el caramelo que se origina del calentamiento del azúcar. [1]

- Colorantes sintéticos: este tipo de aditivos alimentarios se consideran más resistentes que los colorantes naturales, además poseen un mayor poder colorante y una mayor estabilidad en las condiciones de procesado y almacenamiento. Los colorantes sintéticos suelen ser solubles en agua y la forma de presentación puede ser de manera líquida o sólida.

No obstante los colorantes sintéticos presentan también problemas en su uso; por ejemplo, en muchos casos se decoloran por acción del ácido ascórbico, efecto importante en el caso de las bebidas refrescantes, en que esta sustancia se utiliza como antioxidante.



En los últimos años el interés de los consumidores por la seguridad de los alimentos ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales.

La preocupación por la seguridad en el uso de los colorantes sintéticos ha hecho que hayan sido estudiados de forma exhaustiva sus efectos sobre la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales. Ello ha llevado a reducir progresivamente 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.

Algunos ejemplos de colorantes sintéticos serían el azul brillante FCF (E-133), el cual se obtiene como derivado del petróleo y otorga un color azul a los productos añadidos. También se puede destacar el amarillo de quinoleína (E-104) que se obtiene como derivado del indeno y aporta un color amarillo verdoso en las bebidas en las cuales se ha añadido. [1]

### ***1.2.1.3. Legislación***

Según el Anexo I del Real Decreto 2001/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización, existe una lista con los colorantes permitidos en el uso alimentario. (**VER TABLA 1**).

**Tabla 1. Listado de aditivos autorizados**

<b>Número CEE.</b>	<b>Denominación usual</b>
E-100	Curcumina
E-101	i) Riboflabina
	ii) Riboflavina-5'-fosfato
E-102	Tartrazina
E-104	Amarillo de quinoleína
E-110	Amarillo de oca FCF
	Amarillo anaranjado S
E-120	Cochinilla, ácido carmínico, carmines
E-122	Azorubina, carmoisina
E-123	Amaranto
E-124	Ponceau 4R, rojo cochinilla A
E-127	Eritrosina
E-128	Rojo 2G
E-129	Rojo Allura AC
E-131	Azul patente V
E-132	Indigotina, carmín índigo
E-133	Azul brillante FCF
E-140	Clorofilinas
E-141	Complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas
E-142	Verde S, Verde lisamina
	Verde ácido brillante BS
E-150a	Caramelo natural (1)
E-150b	Caramelo de sulfito cáustico
E-150c	Caramelo amónico
E-150d	Caramelo de sulfito amónico
E-151	Negro brillante BN, Negro PN
E-153	Carbón vegetal
E-154	Marrón FK (Pardo FK)
E-155	Marrón HT (Pardo HT)
E-160a	Carotenos
E-160b	Annato, bixina, norbixina
E-160c	Extracto de pimentón, capsantina, capsorrubina.
E-160d	Licopeno
E-160e	Beta-apo-8'-carotenal (C 30)
E-160f	Ester etílico del ácido beta apo-8'-carotenoico (C 30)
E-161b	Luteína
E-161g	Cantaxantina
E-162	Rojo de remolacha, betanina
E-163	Antocianinas
E-170	Carbonato de calcio
E-171	Dióxido de titanio
E-172	Óxidos e hidróxidos de hierro
E-173	Aluminio
E-174	Plata
E-175	Oro
E-180	Litolrubina BK

Fuente: BOE



Cabe destacar que en el ámbito de aplicación de este Real Decreto no se contemplan alimentos, ya sean secos o en forma concentrada y los aromatizantes incorporados durante la elaboración de productos alimenticios compuestos, en razón de sus propiedades aromáticas, sápidas o nutritivas, acompañados de un efecto colorante secundario, tales como el pimentón, la curcuma y el azafrán. Tampoco se tienen en cuenta los colorantes utilizados para colorear las partes exteriores no comestibles de los productos alimenticios, tales como las cortezas no comestibles de los quesos y las envolturas no comestibles de los embutidos.

En los diferentes Anexos de esta norma se explica detalladamente que cada colorante es específico de cada alimento, de manera que existe un colorante que tenga un uso más adecuado en determinados alimentos que otro. Por esta razón la dosis aplicada de un colorante a cierto alimento variará en función de su nivel de toxicidad y del tipo de alimento que se trate.

#### *1.2.1.4. Casas comerciales*

Los diferentes proveedores de colorantes tanto naturales como sintéticos son empresas encargadas de su producción y su posterior distribución o incluso nutraceútics. En este contexto podemos situar a una sociedad empresarial sin ánimo de lucro, que agrupa a más de 120 fabricantes y comercializadores de aditivos y complementos alimentarios, dicha sociedad se conoce como Asociación de Fabricantes y Comercializadores de Aditivos y complementos alimentarios (AFCA).

Algunos ejemplos de empresas dedicadas a la distribución de colorantes alimentarios podrían ser; COLORQUIMICA S.A.S. que se dedica a la producción de aditivos y



colorantes sintéticos y naturales destinados a la industria agroalimentaria o incluso GROW INTERNATIONAL LTDA, que es una nutraceútica cuya función es fabricar ingredientes para la industria agroalimentaria. [7] [8]

## 1.2.2. Colorantes azules

### 1.2.2.1. Listado de colorantes azules

- **Azul Patente V (E-131):** es un colorante sintético no azoico, es decir, no presenta un grupo -azo (-N=N-) en su estructura. Es también conocido con el nombre de *azul sulfán*. Es un colorante utilizado para conseguir tonos azules y también verdes en los alimentos, al combinarlo con colorantes amarillos como el E-102 y el E-104. Se utiliza en conservas vegetales y mermeladas (guindas verdes y mermelada de ciruela, por ejemplo), en pastelería, caramelos y bebidas. Esta sustancia se absorbe en pequeña proporción, menos del 10% del total ingerido, eliminándose además rápidamente por vía biliar. La mayor parte tampoco resulta afectado por la flora bacteriana intestinal, excretándose sin cambios en su estructura. Se ha indicado que puede producir reacciones asimilables a alergias en algunos casos muy raros. **(VER FIGURA 1).** [9]



**FIGURA 1: Azul Patente V (E-131)**

Fuente: Alibaba



- **Indigotina o Carmín de Índigo (E-132):** es un colorante sintético no azoico. Este colorante se puede utilizar legalmente para colorear alimentos. La *indigotina* es uno de los colorantes artificiales menos estable, pudiendo alterarse el color en medios muy ácidos, o en presencia de sulfito. Se utiliza en la elaboración de bebidas, caramelos, licores, hojaldre, confitería, helados, etc. (**VER FIGURA 2**).

[9]



**FIGURA 2: Indigotina o carmín de índigo (E-132):**

Fuente: Ebay

- **Azul Brillante FCF (E-133):** es un colorante sintético no azoico. Este colorante aporta color azul y es sensible a los oxidantes y a la luz. Se considera inocuo, aunque en dosis altas puede acumularse en los riñones y vasos linfáticos. Está presente en refrescos, productos de confitería, etc. (**VER FIGURA 3**). [9]



**FIGURA 3: Azul Brillante FCF (E-133)**

Fuente: Ebay



- ***Espirulina Blue***: es un colorante natural, el cual se considera una cianobacteria filamentosa no diferenciada, habitante de lagos alcalinos, que se cultiva para consumo humano debido a su contenido nutricional. Esta cianobacteria es fuente rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes, por lo que uno de sus principales usos es como suplemento alimenticio, también contiene pigmentos como la ficocianina, carotenoides y clorofila.

Es un aditivo muy popular, de uso en helados, dulces, productos de panificación, postres, etc.

Se ha comprobado su efectividad en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia y leucemia, en otros tipos de cáncer, en reducción de hepatotoxicidad, en enfermedades virales y cardiovasculares, diabetes, obesidad, inmunodeficiencia y procesos inflamatorios, entre otros. (**VER FIGURA 4**) [10]



**FIGURA 4:**  
**Espirulina Blue**

Fuente: Alibaba



- **Natural Blues:** dentro de los pigmentos naturales, existen cuatro tipos principales: clorofilas, carotenoides, antocianinas y betalaínas. Ninguna de las anteriores moléculas mencionadas son azules.

Los colorantes naturales tienen baja estabilidad a la luz, oxígeno, metales, agentes oxidantes, temperatura y pH. Otras dificultades relacionadas con el uso de estos colorantes son la presencia de aroma indeseable, dificultades en la purificación en grandes cantidades y que no coinciden exactamente con las características de color de los colorantes sintéticos utilizados actualmente.

Las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para asegurar una predominancia del catión flavilio.

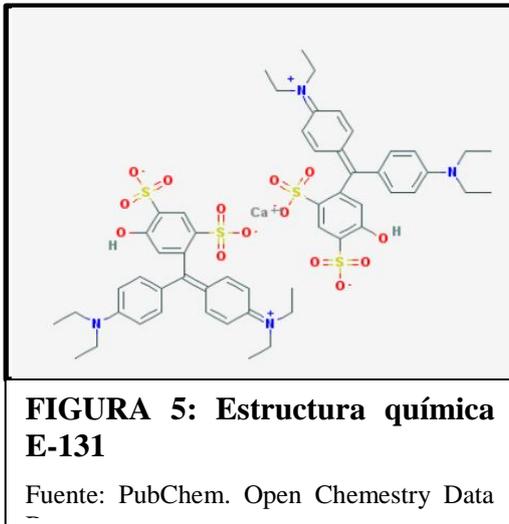
Entre las alternativas de colorantes azules naturales alimentarios pueden ser; el colorante azul violáceo, *Huito*, obtenido de pulpa de fruta Genipa Americana que se encuentra principalmente en América Central y América del Sur, el colorante *Gardenia Blue* (de la planta *Gardenia Jasminoides*) y los antocianos azules. [11]

#### 1.2.2.2. Composición de los colorantes

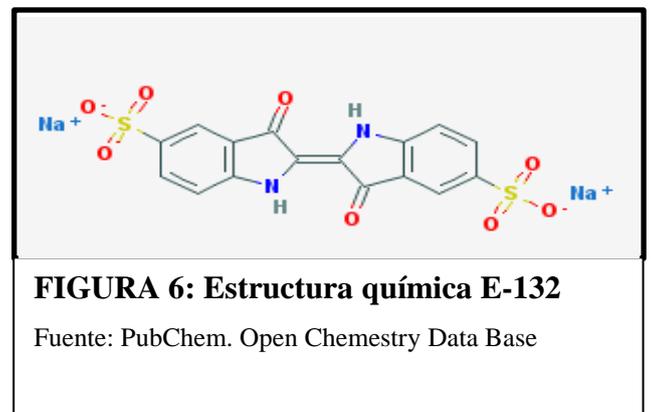
- **Azul Patente V (E-131):** según la IUPAC la forma de nombrar a este compuesto es “Calcio; 4 - [[4- (dietilamino) fenil] - (4-dietilazaniumilidenciclohexa-2,5-dien-1-ilideno) metil] -6-hidroxibenceno-1,3-disulfonato”.



Si dicha sal está compuesta por calcio, la fórmula empírica de dicho colorante es  $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Ca_1$ , si en cambio la sal está compuesta por sodio, la fórmula empírica puede ser  $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Na$  o  $C_{54}H_{62}CaN_4O_{14}S_4$ . Cabe destacar que este colorante tiene una masa molecular de aproximadamente 1159.422 g/mol. (**VER FIGURA 5**). [12]



- **Indigotina o Carmín de Índigo (E-132)**: según la IUPAC la forma de nombrar a este compuesto es “disódico; (2E) -3-oxo-2- (3-oxo-5-sulfonato-1H-indol-2-ilideno) -1H-indol-5-sulfonato”. La fórmula empírica de este colorante es  $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$  y su masa molecular ronda los 466.346 g/mol (**VER FIGURA 6**). [12]

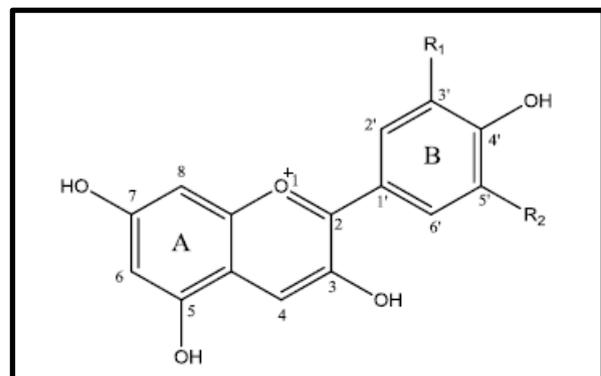






Cabe resaltar que este colorante está compuesto por minerales, como por ejemplo; calcio fosforo, hierro, sodio, cloruros, magnesio, manganeso, zinc, potasio y otros, etc. [10] [13]

- **Natural Blues:** las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina. En lo que respecta a su estructura química se puede afirmar que incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. Cabe mencionar que no se conoce prácticamente ninguna antocianina azul. (**VER FIGURA 8**). [11]



**FIGURA 8: Estructura química Antocianina**

Fuente: Tesis Doctoral: “Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science in the Graduate School of The Ohio State University” by Neda Ahmadiani



### 1.2.2.3. *Propiedades fisicoquímicas de los colorantes*

- ***Azul Patente V (E-131)***: es soluble en agua y etanol y suele ser estable frente a la luz, temperatura, humedad y recubrimientos. Además presenta el pico de máxima absorción en agua a los 638 nm.[14]
- ***Indigotina o Carmín de Índigo (E-132)***: este aditivo se considera soluble en alcohol, agua y etanol, aunque es prácticamente insoluble en benceno, cloroformo y otros disolventes orgánicos. La indigotina es muy sensible a la luz y presenta el pico de máxima absorción en agua a los 608 nm. [12]
- ***Azul Brillante FCF (E-133)***: se considera soluble en agua, éter y etanol, aunque se considera prácticamente insoluble en aceites vegetales. Cabe destacar que el factor más importante para la estabilidad de este colorante en el producto es la luz y la temperatura. El pico de máxima absorción lo presenta a los 630 nm. [12]
- ***Espirulina Blue***: este colorante natural se considera ligeramente soluble en agua. La ficocianina, pigmento ficobilínico azul libre, puede tener la  $\lambda_{\text{máx}}$  de 616-620 nm, sin embargo, es sensible al pH, la luz y la temperatura y posee un peso molecular de 229 kDA. [10]
- ***Natural Blue***: las antocianinas son solubles en agua y en mezcla de agua y alcohol, sin embargo, son insolubles en aceites y grasas. Además poseen una masa molecular de 449,2 g/mol.



La producción de color azul por antocianinas depende de múltiples factores tales como el pH del medio, la estructura molecular de los pigmentos y de los compuestos unidos a las moléculas de antocianina.

El pico de máxima absorción en los colorantes azules totalmente naturales suele estar comprendido entre 596-616 nm [11]



### 1.3 Importancia de la industria de bebidas en el mercado alimentario.

Dentro de la industria de las bebidas existen dos grandes categorías, en la primera encontramos las bebidas sin alcohol, como es el caso de las bebidas energéticas, el café, el té y los zumos de frutas, en una segunda categoría encontramos a las bebidas que contienen alcohol en su composición, dentro de este grupo encontramos las cervezas, los vinos y los licores.

En lo que respecta a la evolución de dicho sector, podemos decir que hay ciertas bebidas como es el té o el vino que han existido desde tiempos inmemorables, aun así la industrialización de todas ellas se ha ido desarrollando en los últimos siglos.

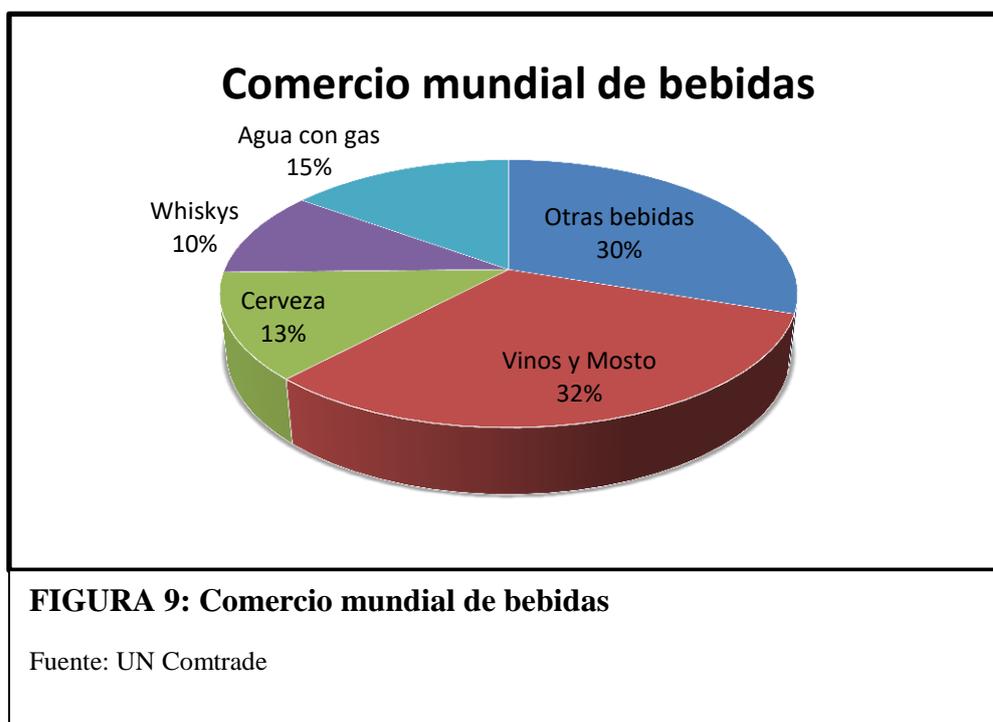
Desde principios de siglo las empresas dedicadas a la producción de bebidas han ido cambiando su comercio local por un comercio más internacionalizado con unas plantas de proceso más grandes y adecuadas a las exigencias del mercado. Este cambio fue ocasionado gracias a las innovaciones en las técnicas de producción de bebidas que otorgaban una mayor seguridad alimentaria y calidad en sus productos finales.

En torno a 1990 surgió una mayor preocupación por la seguridad alimentaria tanto en Europa como en Norteamérica, todo esto condujo a una disminución en las ventas de bebidas alcohólicas ocasionando un consumo aumentado en las no alcohólicas. No obstante ambas categorías de bebidas están proliferando adecuadamente en países en vías de desarrollo como es el caso de África, Asia y Sudamérica. [15]



### 1.3.1. Situación mundial del sector de las bebidas

A nivel mundial tanto las bebidas alcohólicas como los refrescos representan el 80% de los productos del sector de bebidas en la industria de manera global. (VER FIGURA 9).



Dentro de las bebidas alcohólicas, los vinos, las cervezas de malta y el whisky son las principales bebidas con las que se ha comercializado mundialmente.

Según la FAO, en los últimos años la producción mundial de vinos fue superior a 26,4 millones de toneladas siendo Italia, Francia y España los principales países productores. En cambio, la cerveza tuvo una producción superior a 161,9 millones de toneladas siendo China, Rusia y Alemania los países causantes.

En lo que respecta a las exportaciones a nivel mundial, podemos afirmar que Francia, Italia y Australia son los principales exportadores de vinos y mostos de uva, con un 60% de las exportaciones en los últimos años, seguidos de España y Chile, con unas



participaciones del 8% y 6% respectivamente. En cambio las exportaciones de cerveza están muy concentradas en países europeos, siendo Bélgica, Alemania y Holanda los principales países exportadores de esta bebida fermentada, con un 50% de las ventas. Las exportaciones del whisky se centraron sobre todo en Reino Unido con un 70% de exportaciones mundiales, seguido de Estados Unidos y Singapur.

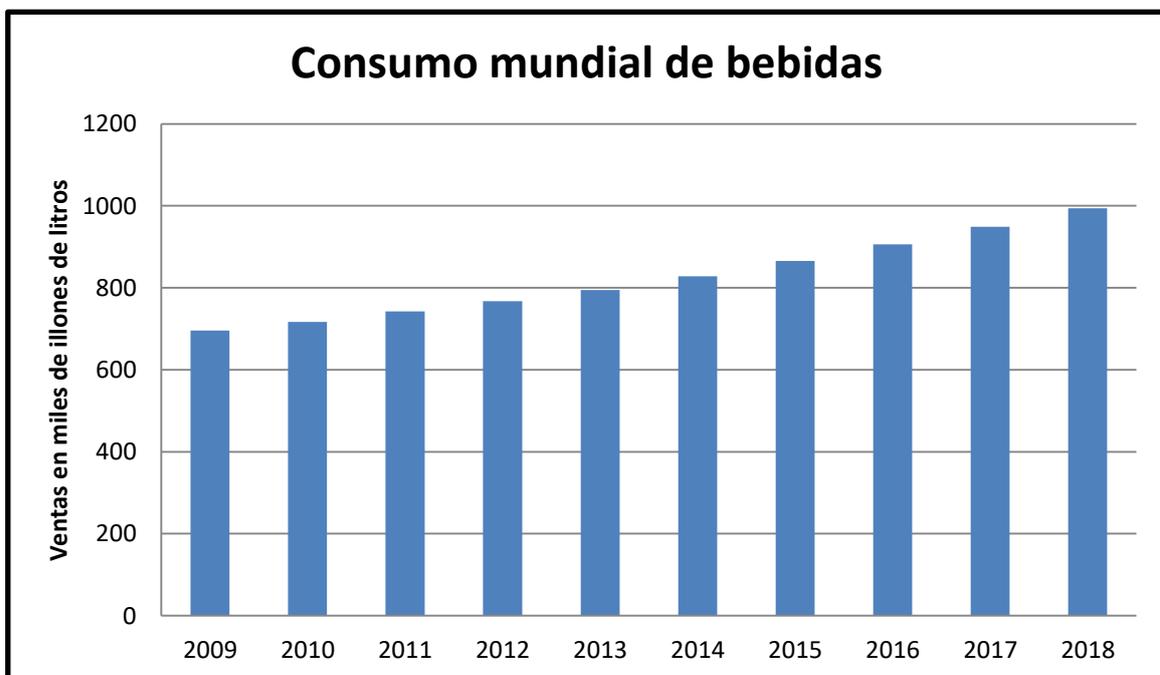
Los países fundamentales importadores de vino fueron Reino Unido y Estados Unidos que concentraron conjuntamente más del 40% de los valores demandados, seguidos por Alemania y Canadá. En lo que respecta a la cerveza Estados Unidos realizó el 40% de las importaciones mundiales, seguido de Reino Unido con el 7,5%; no obstante este país se destaca por un superávit comercial en este producto. Otros demandantes importantes fueron Italia y Francia con el 6,3% y 5,4% del total importado. Estados Unidos, Francia, España y Alemania fueron los mayores importadores mundiales de whisky, concentrando conjuntamente un poco más del 40% de lo importado de este producto.

Dentro de las bebidas no alcohólicas podemos destacar los zumos, las bebidas energéticas, las bebidas isotónicas, etc.

Durante los últimos 10 años el valor de las exportaciones de los zumos ha ido aumentando de manera considerable, siendo Brasil, Países Bajos y Bélgica los principales países exportadores de estos jugos de frutas. Los zumos que son más distribuidos de manera internacional son aquellos que han sido elaborados con manzana y los que han sido elaborados a partir de uvas de mesa. En cambio los países líderes en importaciones de jugo de frutas son Estados Unidos, Alemania y Países Bajos. [16]



De manera general podemos afirmar que el consumo mundial de bebidas ha ido aumentando progresivamente desde el año 2009 donde se vendieron 696,1 miles de millones de litros, hasta el año 2018 donde se han llegado a vender 994,1 miles de millones de litros (**VER FIGURA 10**). [17]

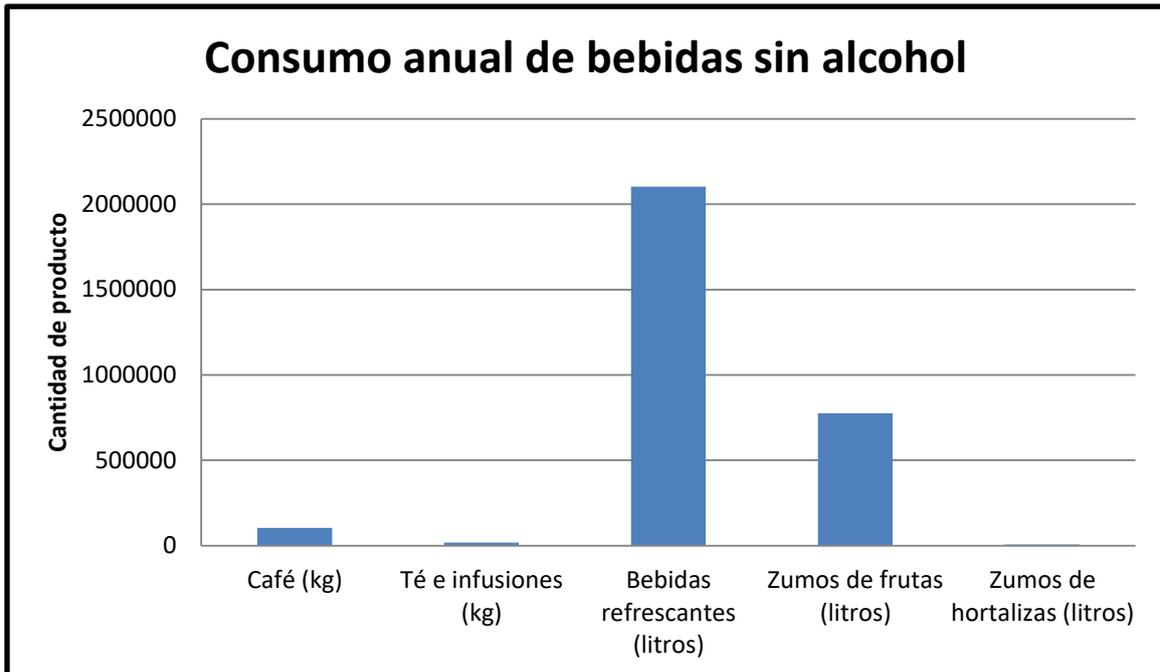


**FIGURA 10: Consumo mundial de bebidas**

Fuente: Stasista

### 1.3.2. Situación nacional del sector de las bebidas

A nivel nacional la producción de bebidas refrescantes se sitúa en torno a 4,6 millones de litros anuales, esto se debe a que son la principal bebida no alcohólica más demandada por los consumidores. El consumo anual de bebidas no alcohólicas se centra principalmente en los refrescos, con un consumo anual de 2.000.000 litros aproximadamente, aunque también tienen importancia los zumos elaborados a partir de fruta. Siendo el té y las bebidas elaboradas a partir de hortalizas, las bebidas menos demandadas. (**VER FIGURA 11**).



**FIGURA 11: Consumo anual de bebidas sin alcohol**

Fuente: Instituto Nacional de Estadística

El comercio exterior de bebidas no alcohólicas en España no parece ser muy significativo, las importaciones resultan ser más importantes que las exportaciones, ya que las importaciones suelen registrar una media de 80 millones de euros anuales, mientras que las exportaciones apenas generan 40 millones de euros anuales.

Los refrescos y bebidas no alcohólicas se pueden obtener principalmente en supermercados, los cuales ofrecen el 73,8% de las ventas totales, también se pueden obtener en hipermercados con un 19,3% de las ventas, o bien en comercios especiales con un 1,1% o bien en otros comercios con un 5,8% de las ventas totales.[18]

El sector de bebidas alcohólicas en España se ha visto afectado notablemente por la crisis económica. Esto ha provocado que la producción nacional de bebidas espirituosas disminuya un 4,9%, llegándose a producir unos 196 millones de litros de bebidas alcohólicas anualmente.



La Federación Española de Bebidas Espirituosas (FEBE) agrupa a 130 empresas productoras y distribuidoras de bebidas espirituosas y productos derivados, con lo que representa a prácticamente el 100% del sector en nuestro país.

La Unión Europea es una gran exportadora de bebidas espirituosas, entre las que se pueden destacar el whisky y el brandy, y sus principales mercados de destino son Rusia, Estados Unidos, China y México.

Las exportaciones en España han crecido un 4,4% en los últimos años, centrandose su mercado en países tales como Alemania, Holanda, Reino Unido, Portugal, Estados Unidos, China y Japón.

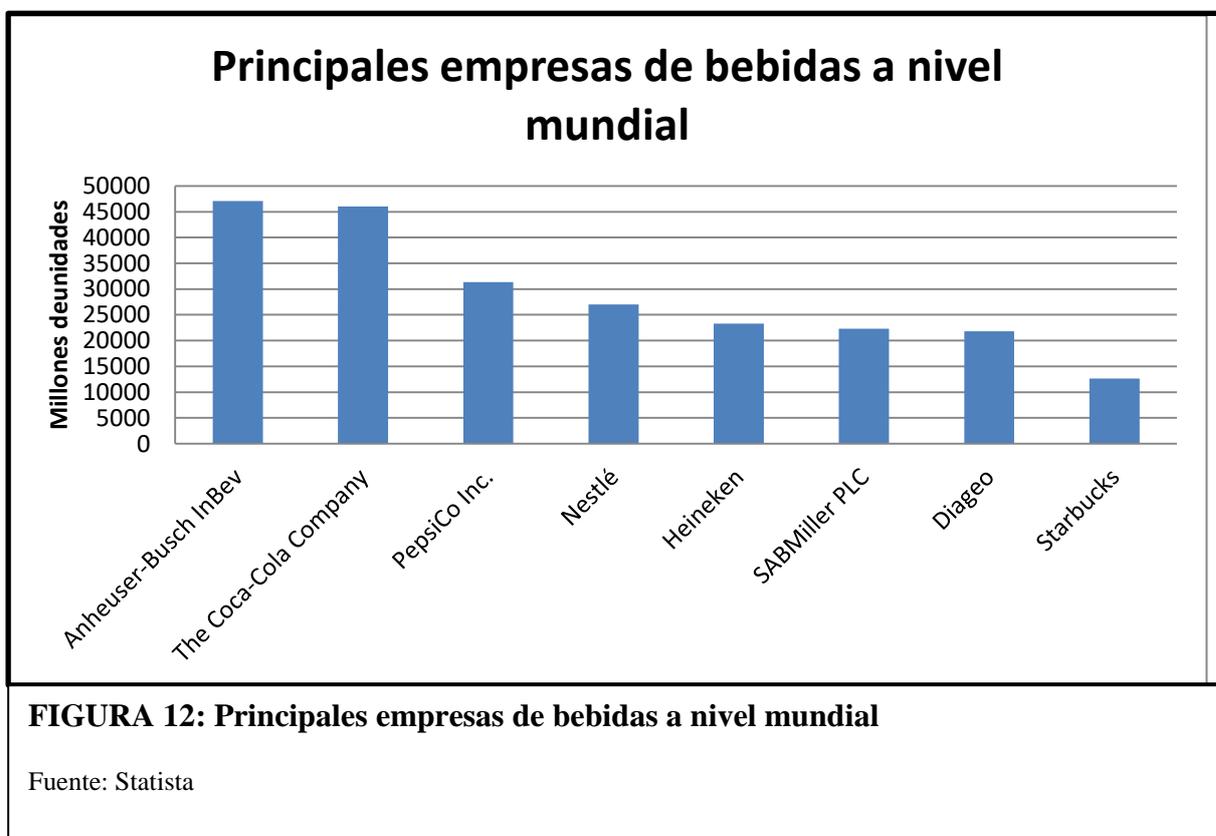
Una gran parte de las bebidas espirituosas que consumimos en España no se elabora en el país, por lo que resulta imprescindible efectuar unas muy significativas importaciones de estos productos, con un valor de más de 900 millones de euros, aunque con una cierta tendencia a la baja. Los proveedores habituales son otros países de la Unión Europea, entre los que destaca Reino Unido (sobre todo en whisky y ginebra). También tienen mucha importancia las importaciones de ron provenientes de países del Caribe.

En cuanto al lugar preferente para la obtención de dichas bebidas principalmente se encuentran los supermercados con un 52,8% del total de ventas, seguidos de hipermercados con un 23%, comercios especializados con un 6,8% y otras formas comerciales con un 11,8%. [19]



### 1.3.3. Principales empresas agroalimentarias de bebidas

Dentro de las empresas internacionales dedicadas a la producción de bebidas tanto alcohólicas como no alcohólicas, podemos destacar aquellas que en los últimos años han obtenido un gran volumen de ventas. Algunas de estas grandes empresas son: Anheuser-Busch Inev, The Coca Cola Company, PepsiCo Inc., Heineken N.V. entre otras. (VER FIGURA 12).



Todas estas empresas han ido mejorando su imagen debido a una serie de innovaciones y tendencias que han tenido en cuenta la hora de su producción, lo que ha ocasionado un aumento en el número de ventas. Algunas estrategias que utilizan las empresas de bebidas no alcohólicas se basan en relacionar sus productos con el ámbito de la salud, creando productos funcionales y de esta manera captando la atención del consumidor.



Un claro ejemplo serían los zumos de hortalizas y frutas, que gracias a la cantidad de antioxidantes, los tipos específicos de fibras dietéticas, los carbohidratos, y el contenido de sustancias bioactivas específicas que presentan, ayudan a reducir los factores de riesgo relacionados con enfermedades crónicas como sería la Diabetes Mellitus tipo 2.

Otra tendencia de la industria de bebidas no alcohólicas se centra en la elaboración de bebidas donde solo se usan ingredientes totalmente naturales para su producción. Una última tendencia en este sector se basa en la elaboración de bebidas libres de ingredientes no deseables, como por ejemplo las bebidas sin azúcar.

Otras estrategias utilizadas por las industrias de bebidas alcohólicas se basan en la creación de nuevos productos mejorando de esta manera su línea de producción y las propiedades organolépticas de su producto final.

En ambos tipos de bebidas se tiene muy en cuenta el diseño del envase para captar la atención de los consumidores en los canales de distribución, también se presta especial atención a sus posibles efectos medioambientales y sobre todo la publicidad que se hace del producto. [20]



## 2.-Objetivos

Actualmente en la industria agroalimentaria se utiliza principalmente el colorante E-133 para dar un color azul a bebidas tanto alcohólicas como refrescantes.

El presente trabajo fin de grado persigue los siguientes objetivos

1. Aplicar métodos analíticos como la espectrofotometría y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para llevar a cabo el control de calidad de bebidas azules, conocer la concentración y tipo de colorantes azules utilizados y sus posibles productos de degradación durante el tiempo de almacenamiento.
2. Estudiar la estabilidad del colorante en las diferentes bebidas comerciales, explicando los factores y condiciones que influyen en dicha estabilidad.
3. Búsqueda de colorantes naturales, como la *Espirulina Blue* o *Natural Blues*, que sirvan de sustitutivos para el colorante usado con mayor frecuencia en el sector de bebidas a nivel mundial. También se estudia su estabilidad a valores de pH de las bebidas, entre 2 y 3,5.



### 3.-Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1. Bebidas y colorantes

Para el correcto desarrollo del análisis y la estabilidad de los colorantes alimentarios azules en bebidas comerciales, han sido necesarias diferentes bebidas, alcohólicas como es el caso de diferentes tipos de vinos.



**FIGURA 13: Diferentes vinos comerciales con colorante azul**

Fuente: Elaboración propia

Dentro de los vinos utilizados en los experimentos, podemos distinguir *Blue Hawaii*, *Don Luciano Blue Moscato*, *Velvet*, *Alma*, y *MD Alcantara*. Sin embargo, también se utilizaron vinos que no contienen ningún tipo de colorante en su composición, como es el caso de *Don Luciano Gold Moscato* (**VER FIGURA 13**)



También fueron necesarias bebidas azules sin alcohol como sería el caso de bebidas isotónicas, bebidas refrescantes con zumo de frutas y tónicas. (VER FIGURA 14)



**FIGURA 14: Diferentes bebidas sin alcohol comerciales con E-133**

Fuente: Elaboración propia

Cabe resaltar que los canales de distribución de las diferentes bebidas son los supermercados, hipermercados o incluso grandes centros comerciales.

En lo que respecta a las bebidas sin alcohol, podemos encontrar tres grupos; un primer grupo serían las bebidas isotónicas, destacando *Powerade Blue* y *Upgrade Blue*, las cuales contienen el colorante E-133 en su composición y *Aquarius* que no posee ningún tipo de colorante. Un segundo grupo son las bebidas carbonatadas sin alcohol como *Nordic Tonic Blue* y *Original Premium Tonic*, que tienen el azul brillante como colorante, y *Nordic Tonic Water* y *Soda Schweppes* que no poseen ningún tipo de colorante. Un último grupo de bebidas refrescantes serían las bebidas refrescantes con zumo de frutas, entre las que



destacamos *Sunny Delight Blue* y *Fusión de frutas* que contienen E-133 en su composición.

Los colorantes alimentarios azules obtenidos de los diferentes proveedores se consideran un material necesario para el adecuado desarrollo del trabajo. Los más característicos son; E-131 o también conocido como *Azul patente V*, E-132 o *Indigotina*, E-133 o denominado *Azul brillante FCF*, la *Espirulina Blue* y *Natural Blues*.

La casa comercial de los colorantes azules sintéticos y de *Espirulina Blue* es **ROHA (Roha, Europe SLV, Torrente, Valencia)**, mientras que la casa comercial del colorante *Natural Blue* es **Sensient Food Colors (Sensient Technology Corporation, WI, USA)**.

### 3.1.2. Materiales y equipos de laboratorio

Todos los experimentos realizados en el laboratorio necesitaron de materiales específicos, como pueden ser pipetas automáticas de laboratorio, pipetas manuales o incluso pipetas de vidrio graduadas.

Cabe destacar que para almacenar las bebidas de los experimentos en el frigorífico, se utilizaron unos frascos de vidrio transparentes de diferentes formas y tamaños dependiendo del volumen que fuese necesario.

Los equipos instrumentales que se han utilizado durante el desarrollo de los experimentos, han sido:



- pH-metro: se encarga de medir el pH de las diferentes bebidas comerciales. (**VER FIGURA 15**)



**FIGURA 15: pH-metro**

Fuente: Elaboración propia

- Espectrofotómetro UV-Vis: el tipo de espectrofotómetro utilizado fue *espectrofotómetro UV-Visible modelo 8453* (Agilent, USA), el cual se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Este equipo mide la relación que hay entre la absorbancia y las diferentes longitudes de onda (**VER FIGURA 16**). [21]



**FIGURA 16: Espectrofotómetro UV-Vis**

Fuente: Elaboración propia



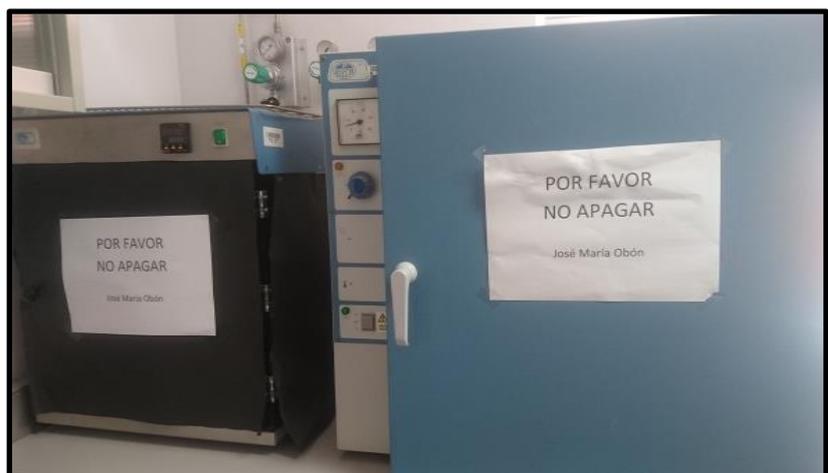
- HPLC: el modelo usado fue *HPLC Agilent Serie 1200*. Este equipo es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. **(VER FIGURA 17)** [22]



**FIGURA 17: HPLC**

Fuente: Elaboración propia

- Estufas: Las estufas utilizadas en el laboratorio son del tipo *universales de precisión*, y se usaron para mantener una temperatura constante de 80 o 50 °C de las bebidas. **(VER FIGURA 18)**

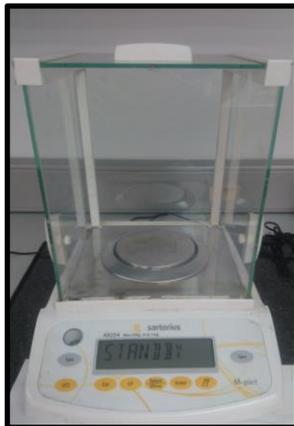


**FIGURA 18: Estufas**

Fuente: Elaboración propia



- Balanza: el tipo de balanza usada fue *Sartorius AX224*. Este equipo se encarga de medir el peso de diferentes compuestos. Las unidades de referencia son los kilogramos (kg). La balanza electrónica tiene una precisión de décimas de miligramos.(**VER FIGURA 19**).



**FIGURA 19:**  
**Balanza electrónica**

Fuente: Elaboración propia

- Agitadores magnéticos: los modelos de agitadores magnéticos utilizados fueron; *Agimatic E*. Este equipo favorece la disolución de compuestos en un medio determinado gracias a la aportación de calor y la acción de un movimiento giratorio facilitado por un motor y un núcleo de agitación. (**VER FIGURA 20**)



**FIGURA 20: Agitadores magnéticos**

Fuente: Elaboración propia



## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Medida de pH

La función principal del pH-metro se basa en la medición exacta del pH de la disolución en cuestión. En lo que respecta a la temperatura, se puede afirmar que este aparato viene provisto de una sonda térmica, la cual aporta información sobre la temperatura a la que se encuentra la bebida que se está analizando. El volumen que se debe añadir a un vaso de precipitado debe de ser el suficiente para que tanto la sonda térmica como la sonda que mide el pH queden bañadas completamente por la disolución.

Antes de empezar a utilizar este equipo, este se debe calibrar con unas disoluciones preparadas que se encuentran a un pH de 4,01 y 7,00 (**VER FIGURA 21**). De esta manera sabemos que la lectura tomada por el equipo será lo más exacta posible.

En el laboratorio se llevaron a cabo dos experimentos diferentes con el pH-metro. El primer experimento consistió en medir el pH inicial de las bebidas para ver su influencia en el posterior ensayo de estabilidad, y el segundo experimento se basó en variar sus pH iniciales para ver la influencia de los diferentes colorantes a distintos niveles de pH.



**FIGURA 21: Disoluciones preparadas pH-metro**

Fuente: Elaboración propia

En los experimentos relacionados con la estabilidad de las bebidas comerciales fue necesario variar su pH para estudiar la degradación del colorante E-133 a pH similares. El ajuste del pH, se realizó adicionando a las bebidas una disolución de ácido cítrico o de hidrogenocarbonato de sodio consiguiendo una reducción considerable de su pH, también



se les adicionó una disolución de hidróxido de sodio para aumentar el pH de la bebida en cuestión.

### 3.2.2 Ensayos de estabilidad en estufas

En las estufas se llevó a cabo el calentamiento de las diferentes bebidas en condiciones de oscuridad, para ver su posterior degradación en función de la temperatura a la que estaban sometidas. Se pusieron a 50 y 80°C las bebidas no alcohólicas, en cambio, los vinos debido a su contenido en alcohol solo se introdujeron en la estufa que tenía una temperatura de 50°C para evitar una pérdida de alcohol en su composición.

Este método de exposición de las bebidas a ciertas temperaturas se alargó en función del tiempo que tardaron en degradarse las mismas, en caso de que existiera dicha degradación.

### 3.2.3 Disolución de colorantes

Los agitadores magnéticos fueron utilizados para la dilución de los colorantes naturales, tanto la *Espirulina Blue* como *Natural Blue*, en diferentes bebidas que no contenían ningún tipo de colorante en su composición, como fueron; *Aquarius*, *Nodic Tonic Water*, *Soda Schweppes* y *Don Luciano Gold Moscatto*.

### 3.2.4. Métodos de análisis de colorantes: espectrofotometría UV-Visible

Uno de los métodos utilizados para analizar los colorantes en la composición de las bebidas fue la espectrofotometría UV-Vis. Como hemos comentado anteriormente en el



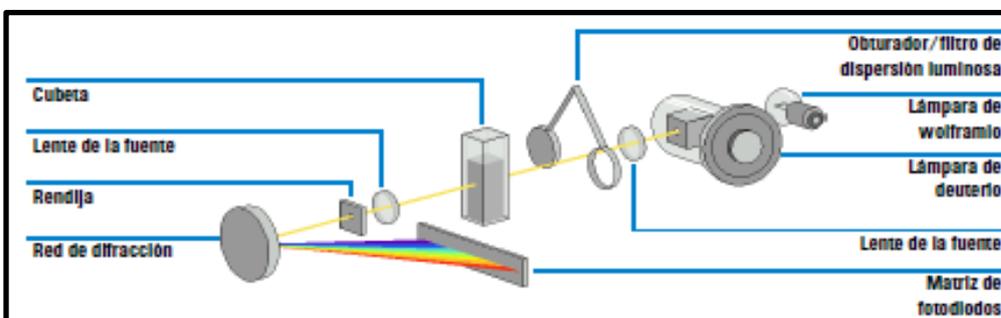
apartado 3.1.3, este método consiste en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética que puede absorber o transmitir una determinada muestra.

Todas las bebidas que contenían el colorante E-133 o cualquier otro colorante azul, tanto alcohólicas como no alcohólicas, fueron estudiadas por este procedimiento, para obtener información sobre el pico de máxima absorción en una determinada región de longitud de onda.

El hecho de que las bebidas presenten un color azulado, es debido a que absorben ciertas frecuencias o longitudes de onda del espectro visible y transmiten otras. Por esta razón el rango de longitudes de onda que se estudió fue el rango de radiación visible (380-750 nm).

En un rango de longitudes de onda entre 595-650 nm el color que absorben las muestras es naranja. En cambio, el color que transmiten y el que nosotros apreciamos a simple vista es un verde-azulado, debido a la presencia de los diferentes colorantes utilizados. [23]

Antes de realizar las medidas correspondientes, se llevó a cabo la calibración del equipo con agua destilada. Esto es lo que se conoce como medida en blanco. El agua se situó en una cubeta, la cual se introdujo en el sistema óptico del espectrofotómetro, para poder llevar a cabo la calibración. (**VER FIGURA 22**).



**FIGURA 22: Sistema óptico de un espectrofotómetro**

Fuente: Agilent



El espectrofotómetro es un instrumento de un único haz, y por ello debe realizar una medida en blanco antes de poder medir una muestra. Para medidas de alta precisión, la medida en blanco y de la muestra deben realizarse con un intervalo de tiempo muy breve. [21]

Una vez que se calibró el equipo, las muestras de bebidas se colocaron en la cubeta, para poder analizarlas correctamente. De esta manera se obtuvieron datos sobre la absorbancia de todas las bebidas en el rango de longitud de onda especificado.

Este método de análisis de colorantes también fue utilizado para el estudio de la estabilidad de bebidas con E-133 y que contienen una absorbancia próxima a la unidad.

### **3.2.5. Métodos de análisis de colorantes: Análisis por HPLC**

Otro método utilizado para analizar los colorantes en las bebidas fue la cromatografía líquida de alta eficacia.

En cromatografía líquida, la muestra se disuelve en una fase móvil, que en este caso se considera un líquido. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de modo que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.



La cromatografía líquida de alta resolución se diferencia de la cromatografía líquida convencional, en que utilizan columnas de longitudes comprendidas entre 3 y 30 cm con rellenos de tamaño de partícula de diámetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , mientras que en la cromatografía líquida convencional las columnas empleadas tienen longitudes de 50 a 500 cm y diámetros de partícula de 150 a 200  $\mu\text{m}$ . [22]

El HPLC utiliza el método de adsorción para la separación molecular. Cabe resaltar que la fase estacionaria en este equipo se considera un compuesto sólido mientras que las móviles son; acetonitrilo, agua, amoniacó y ácido acético.

El HPLC utilizado en el trabajo (Agilent, USA) tiene una columna C18 de 3,5  $\mu\text{m}$  (4,6 x 150 mm) Zorbax SB, termostaticada a 40°C. Cabe remarcar que el método utilizado en este equipo contempla una fase móvil A y una fase móvil B. La fase móvil A está compuesta por Acetato amónico 35 mM, a un pH de 7,0 con Acetonitrilo al 1%, mientras que la fase móvil B contiene Acetato amónico 35 mM, a un pH de 7,0 y con Acetonitrilo al 50%.

El gradiente utilizado se puede observar en la TABLA 2. (**VER TABLA 2**)

**Tabla 2. Gradiente fase móvil B**

Tiempo (minutos)	%B
0	10
1	10
17	30
26	100
36	100
37	10
40	10

Fuente: Elaboración propia

Las muestras a analizar se situaron en unos frascos de cristal de pequeño tamaño (viales de 1 ml), los cuales se colocaron en el muestreador automático del equipo. De esta manera el equipo puede funcionar de manera continua sin necesidad de ser interrumpido. Cabe destacar que el volumen estándar de inyección fue de 5 $\mu$ l.

Para realizar adecuadamente el análisis de las bebidas mediante el espectrofotómetro y el cromatografo líquido de alta eficacia fue necesario eliminar la turbidez presente en determinadas bebidas. La eliminación de la turbidez de las bebidas se llevó a cabo mediante el uso de filtros de celulosa regenerada de 0,45  $\mu$ m desechables (Agilent, USA).

Inicialmente se obtuvieron los cromatogramas de los diferentes colorantes sintéticos alimentarios (E-131, E-132 y E-133). Posteriormente se llevó a cabo el análisis de las bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas, que contenían colorante azul en su composición. Los datos que se recogieron se compararon con los datos obtenidos anteriormente de los diferentes colorantes azules.



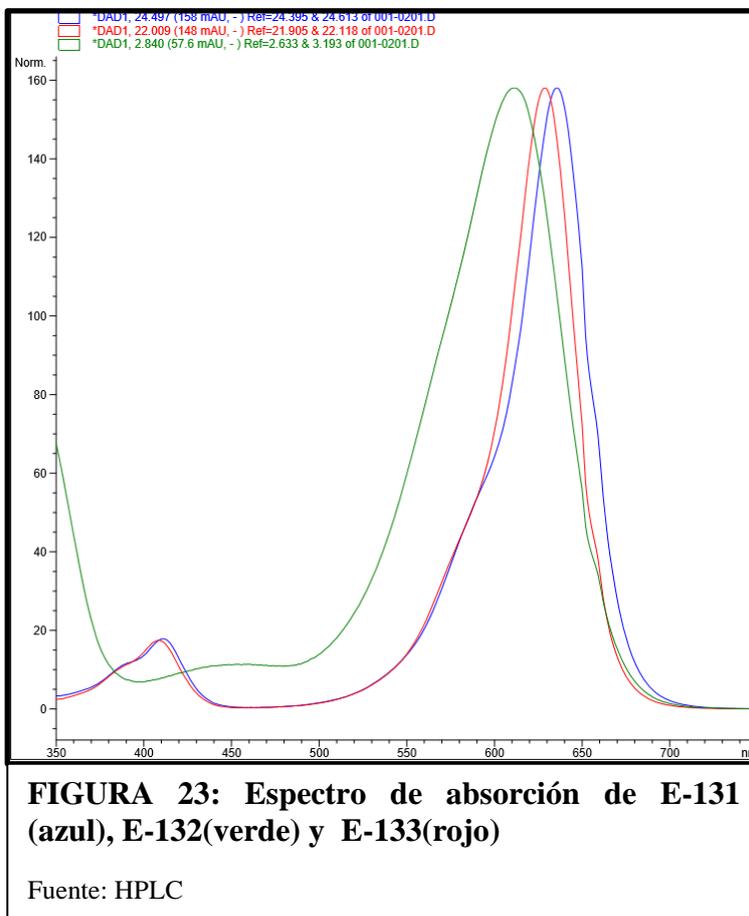
## 4.-Resultados y discusiones

### 4.1. Análisis de colorantes alimentarios azules en bebidas comerciales

#### 4.1.1. HPLC. Cromatografía líquida de alta eficacia en colorantes azules

El interés de analizar los colorantes alimentarios azules, radica en demostrar la presencia del colorante estudiado en las diferentes bebidas y de estimar la cantidad adicionada.

Para poder afirmar la presencia del colorante, se realizaron estudios analíticos mediante HPLC y espectrofotometría. En los estudios realizados a través de HPLC se obtuvieron los diferentes espectros de los colorantes sintéticos azules; E-131, E-132 y E-133 (**VER FIGURA 23**).





En los espectros de los colorantes se pueden apreciar los diferentes picos de absorción máxima según el rango longitud de onda. De esta manera, podemos concluir que el colorante E-131 presenta su pico de máxima absorbancia a los 635 nm, mientras que el colorante E-132 tiene su pico a los 610 nm y el colorante E-133 lo posee a los 630 nm.

Cabe destacar que los colorantes E-131 y E-133 presentan un segundo pico de absorción máxima a una longitud de onda próxima a los 410 nm, mientras que el colorante E-132 no presenta dicho pico de absorción.

Como explicamos anteriormente en el apartado 3.2.4, en un rango de longitudes de onda entre 595-650 nm el color que absorben las muestras es naranja. En cambio, el color que transmiten y el que nosotros apreciamos a simple vista es un verde-azulado.

Gracias al estudio de espectrofotometría de los colorantes, podemos afirmar que para que una bebida contenga cualquiera de los colorantes anteriormente mencionados, está debe presentar su pico de máxima absorbancia en el rango de longitud de onda característico de cada colorante. De esta manera quedaría demostrada la presencia o ausencia de cierto colorante en la bebida estudiada.

Este equipo de análisis aporta datos muy significativos, entre los que destacamos; el tiempo de retención de cada compuesto presente en la muestra, medido en minutos, y también el área encerrada en cada pico del cromatograma.

El cromatografo líquido de alta eficacia se encarga de la separación molecular mientras que existe un detector UV-VIS auxiliar que tiene como función principal la identificación de los compuestos separados por el HPLC mediante la absorción de luz de la muestra a diferentes longitudes de onda.



Los resultados obtenidos del análisis de los patrones a diferentes concentraciones se muestran en la TABLA 3.

A la hora de analizar los colorantes en el HPLC, se ha llegado a la conclusión que los colorantes E-131 y E-133 poseen tiempos de retención relativamente altos (24,5 y 22 min respectivamente), mientras que el colorante E-132 posee un tiempo de retención menor (2,84 min. (**VER TABLA 3 y FIGURAS 24-26**)).

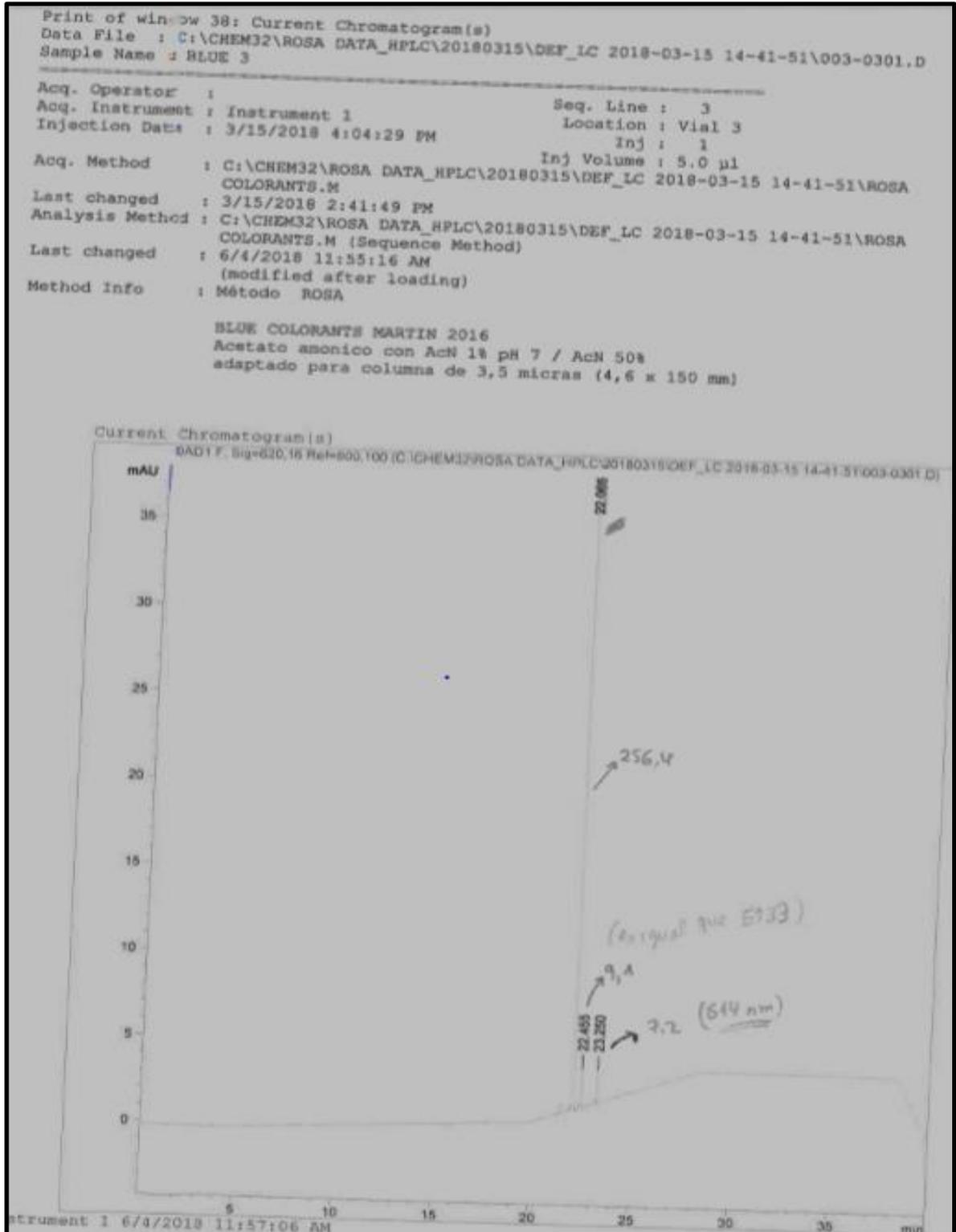
**Tabla 3. Análisis de los colorantes**

<b>Colorante</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b><math>\lambda</math> máx (nm)</b>
E-131	24,5	635
E-132	2,84	610
E-133	22,02	630

Fuente: Elaboración propia







**FIGURA 26: Cromatograma del colorante E-133**

Fuente: HPLC



Si queremos trasladar estos análisis a las bebidas comerciales para comprobar realmente si poseen algunos de estos colorantes, bastará con analizar dicha bebida mediante el HPLC y el detector UV-VIS y comprobar si se produce un pico máximo de absorción en el tiempo de retención estimado para ese colorante. De esta forma podemos aclarar que colorante alimentario azul ha sido suministrado a las diferentes bebidas.

Además deben de coincidir el espectro del compuesto a ese tiempo de retención con el del colorante azul esperado.

#### **4.1.2. Recta de calibrado.**

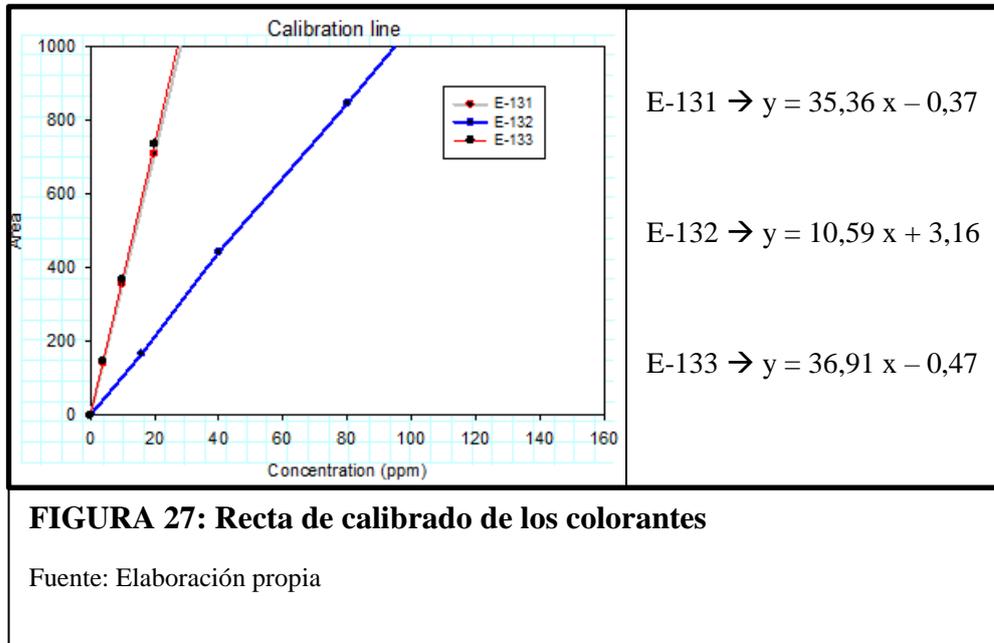
La importancia de calcular una recta de calibrado para cada colorante, que relacione el área encerrada en los picos del cromatograma con la concentración medida en partes por millón (ppm), radica en la posibilidad de calcular la cantidad de colorante añadido a una bebida comercial.

Para poder calcular dichas rectas tenemos que conocer el área encerrada en el pico de máxima absorción del cromatograma de cada colorante, que es un dato que proporciona el equipo al realizar el análisis de cada colorante, y también debemos de saber la concentración, la cual se establece al inicio del experimento de manera manual.

En la elaboración de la recta de calibrado de los colorantes E-133 y E-131 se prepararon muestras del analito de concentraciones de 5-10-20 ppm, en cambio para realizar la recta de calibrado del colorante E-132 se prepararon muestras del analito de concentraciones de 20-40-80 ppm.



Este colorante tiene una menor absorptividad molar ( $E^{1\%} = 480$ ) frente al E-131 ( $E^{1\%} = 2000$ ) y al E-133 ( $E^{1\%} = 1630$ ) (**VER FIGURA 27**).



El hecho de utilizar mayores concentraciones en el colorante E-132 se debe al hecho de que posee un poder colorante más débil. De esta forma se pudo obtener adecuadamente su cromatograma, ya que si se hubiesen utilizado concentraciones menores no podría visualizarse.

Una vez que se ha obtenido la ecuación de la recta de cada colorante, se puede calcular la concentración de colorante en las diferentes bebidas comerciales. Dicha concentración se calcula sustituyendo el área en la ecuación de la recta característica del colorante. De esta manera podremos saber la concentración de colorante adicionado a las bebidas comerciales en función del área obtenida del cromatograma.



#### 4.1.3. Análisis por HPLC de bebidas comerciales

Se analizaron tanto las bebidas alcohólicas como no alcohólicas mediante el HPLC. A través de dicho análisis se pudo comprobar que tipo de colorante alimentario azul poseían, en función del tiempo de retención de cada colorante presente en la bebida en cuestión. Ya que anteriormente se habían estudiado los tiempos de retención de cada colorante alimentario azul.

Este estudio también tiene como finalidad calcular la concentración de colorante adicionada a la bebida comercial gracias a la recta de calibrado calculada anteriormente.

Como queda explicado en el apartado 4.1.2. conociendo el área del pico característico de cada colorante y sabiendo la recta de calibrado de cada colorante podemos averiguar que concentración posee la bebida en cuestión. Los resultados obtenidos se presentan en la **TABLA 4. (VER TABLA 4 y FIGURAS 28-38)**



**Tabla 4. Análisis por HPLC de las bebidas**

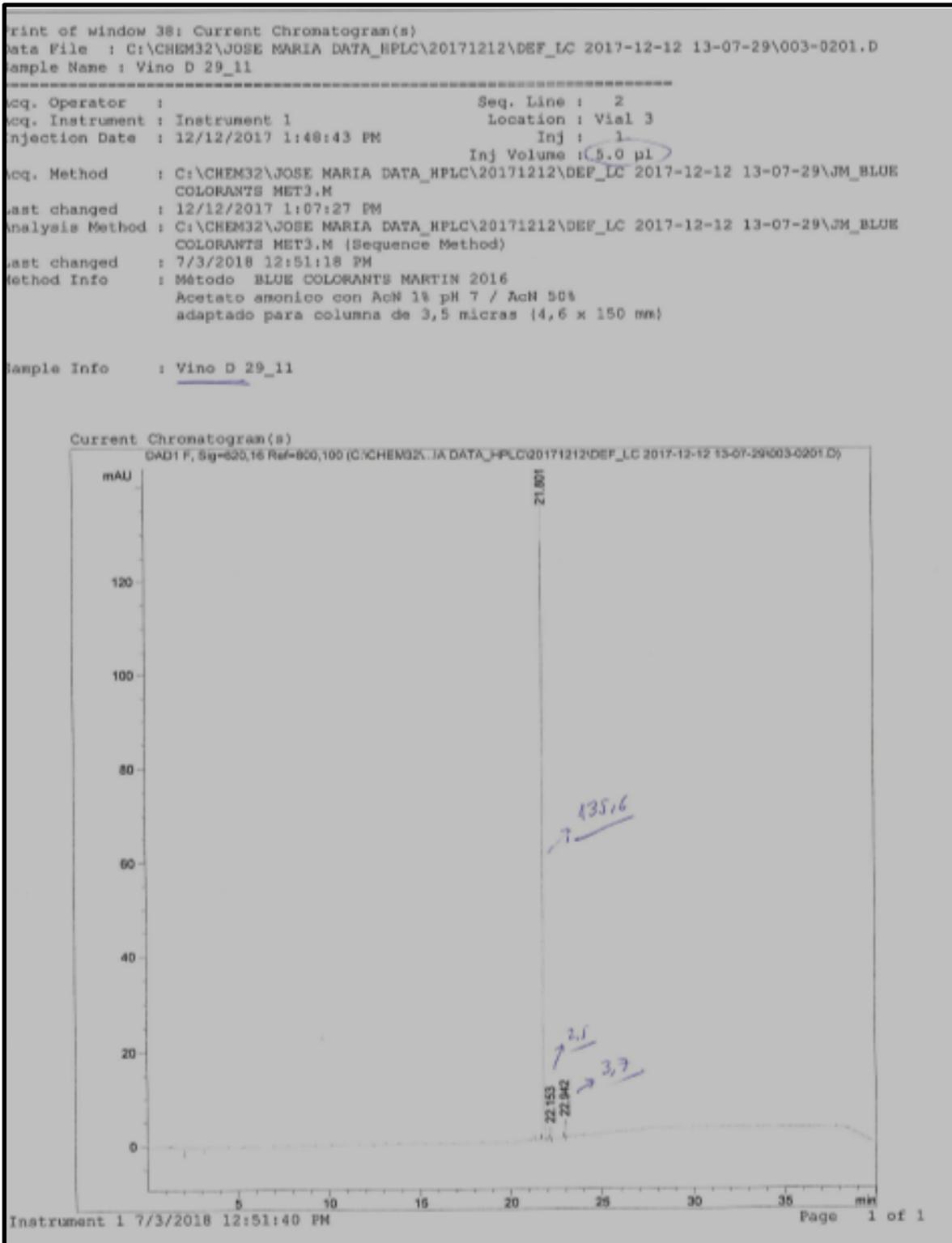
<b>Bebidas</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Colorante</b>	<b>Área (mAU min)</b>	<b>Ecuación de la recta</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
<i>Vino A</i>	21,722	E-133	970,1	$y = 36,91x - 0,47$	$26,3 \pm 0,1$
<i>Vino B</i>	21,892	E-133	59,7	$y = 36,91x - 0,47$	$1,6 \pm 0,1$
<i>Vino C</i>	21,798	E-133	342,6	$y = 36,91x - 0,47$	$9,3 \pm 0,1$
<i>Vino D</i>	21,801	E-133	135,6	$y = 36,91x - 0,47$	$3,7 \pm 0,1$
<i>Vino E</i>	24,150	E-132	366,6	$y = 35,56x - 0,37$	$10,3 \pm 0,1$
<i>Isotónica 1</i>	21,935	E-133	147,2	$y = 36,91x - 0,47$	$4,0 \pm 0,1$
<i>Isotónica 2</i>	21,985	E-133	124,5	$y = 36,91x - 0,47$	$3,4 \pm 0,1$
<i>Bebida Zumos 1</i>	22,004	E-133	394,5	$y = 36,91x - 0,47$	$10,7 \pm 0,1$
<i>Bebida Zumos 2</i>	22,073	E-133	106,9	$y = 36,91x - 0,47$	$2,9 \pm 0,1$
<i>Tónica 1</i>	22,100	E-133	52,3/2	$y = 36,91x - 0,47$	$0,7 \pm 0,1$
<i>Tónica 2</i>	22,071	E-133	113,3/2	$y = 36,91x - 0,47$	$1,5 \pm 0,1$

Fuente: Elaboración propia









**FIGURA 31: Cromatograma de *Vino D***

Fuente: HPLC

















Por ejemplo, el *Vino A* al analizarlo en el HPLC presenta un tiempo de retención de 21,72 minutos, lo que indica que tiene el colorante E-133 en su composición, ya que el tiempo de retención característico de este colorante es de 22,02 minutos. Como sabemos que posee dicho colorante sabemos también su correspondiente recta de calibrado ( $y = 36,91x - 0,47$ ). Un dato que también nos ofrece su análisis es que posee un área de 970,1.

Con todos estos datos obtenidos podemos calcular la concentración de E-133 en el vino sustituyendo el área en la recta de calibrado y despejando adecuadamente:

$$y = 36,91x - 0,47 \rightarrow 970,1 = 36,91x - 0,47 \rightarrow x = 26,29 \text{ ppm}$$

De esta manera podemos saber el tipo de colorante alimentario azul presente en la bebida y la concentración adicionada.

Del estudio analítico mediante HPLC realizado en las bebidas comerciales se llegó a la conclusión de que no existen adulteraciones en su composición. Además, la concentración del colorante E-133 adicionado a las bebidas se encuentra en el rango de 1,43 A 26,29 ppm, mientras que la concentración del colorante E-132 presente en el *Vino E* alcanza los 10,31 ppm.

Según la legislación, la dosis diaria admisible del colorante E-133 es de 12,5 miligramos (mg) por kilogramos (kg) de peso corporal. Por lo tanto, un niño que pese unos 10 kg podrá consumir una cantidad de 125 mg diarios. Se puede asegurar la viabilidad comercial de las bebidas, ya que la que mayor concentración posee, tiene 26,29 mg/l, lo que supondrá un consumo de prácticamente 5litros al día

En el caso del colorante E-132, la dosis diaria admisible es de 5 mg por kg de peso corporal. De esta manera un adulto que tenga un peso corporal de 50 kg podrá consumir 250 mg/l diarios de este colorante. El único vino que posee dicho colorante posee una



concentración de 10,31 ppm, con lo cual queda demostrada la viabilidad comercial de este colorante, debido a que esta cantidad es inferior a la dosis diaria admisible. Supondría un consumo diario de 24 litros..



## 4.2. Estabilidad de colorantes azules en disolución

### 4.2.1. Ensayo de estabilidad de bebidas comerciales

El primer paso que se realizó para el ensayo de estabilidad de las bebidas comerciales fue la medición de su pH. Los vinos mostraron un pH de 3,0, mientras que las bebidas isotónicas tenían niveles de 3,0-3,5, las bebidas refrescantes con zumo de fruta alcanzaron niveles de pH de 2,5-3,0, y las tónicas tuvieron niveles de pH de 2,5.

Las bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas, que contenían algún tipo de colorante azul alimentario se introdujeron en diferentes estufas para comprobar la estabilidad de los colorantes en función de la temperatura.

Los refrescos como hemos mencionado en el apartado 3.2.2 se mantuvieron a temperaturas de 25, 50 y 80°C para observar el tiempo de degradación a diferentes temperaturas, mientras que los vinos se conservaron únicamente a temperaturas de 25 y 50°C. La razón de no exponer los vinos a 80°C se basó en la posibilidad de la eliminación del alcohol que se encuentra en la composición de cada vino, ya que el punto de ebullición del alcohol es de 78,32°C.

El tiempo de exposición estimado en la degradación acelerada de las bebidas a las temperaturas marcadas varió en función de la degradación observada, es por eso que por ejemplo los vinos se dejaron a 50°C durante 27 días mientras que las bebidas no alcohólicas estuvieron aproximadamente unos 12 días a 80°C. La diferencia de días observados entre ambos grupos dependió de la composición de cada bebida y de su contenido o no en alcohol.



Los ensayos acelerados de estabilidad a 80°C mostraron altos niveles de degradación de las bebidas comerciales en un periodo de tiempo relativamente corto, mientras que en dicho periodo de tiempo las bebidas que fueron expuestas a temperaturas inferiores aún no habían mostrado evidencias de la degradación del colorante en su composición.

Se llegaron a observar cambios físicos en las bebidas. Los cambios observados hacían referencia al color de la propia bebida, dicho color iba perdiendo su tono azul característico y viraba de color en función de la composición de la bebida en cuestión. Este cambio físico pudo ser explicado mediante la variación de los espectros de absorción de cada bebida en la región de la radiación visible.

#### **4.2.1.1. Ensayo de estabilidad de vinos.**

Todos los vinos poseen el colorante E-133 en su composición, excepto el *Vino E* que posee el colorante E-132. Estas bebidas alcohólicas fueron introducidas en las respectivas estufas a 25 y 50°C durante los 27 días que duró el experimento.

Durante estos días se tomaron diferentes muestras para realizar un análisis de espectrofotometría de los vinos. De esta manera se consiguió demostrar el cambio de color en función de la variación del espectro de absorción en la región de longitud de onda del espectro visible (400-750 nm).

Las muestras de los vinos fueron tomadas a los 0, 5, 7, 14 y 27 días para observar la degradación de los colorantes de una forma más gradual.

De forma general se pudo afirmar que los vinos que fueron expuestos a temperaturas de 25°C no tuvieron ningún tipo de degradación del color tras los 27 días, mientras que los



vinos que fueron expuestos a temperaturas de 50°C habían sufrido un cambio de color de una tonalidad azul a verdoso. (VER FIGURAS 39 Y 40)



**FIGURA 39: Estabilidad de vinos a 25°C (27 días)**

Fuente: Elaboración propia



**FIGURA 40: Estabilidad de vinos a 50°C (27 días)**

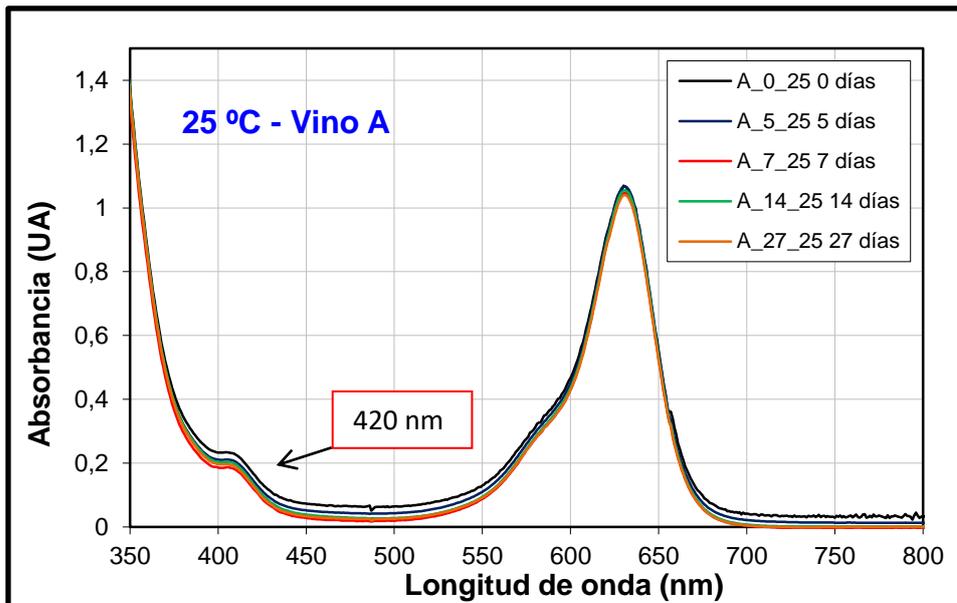
Fuente: Elaboración propia



Del estudio de estabilidad de los vinos en el espectrofotómetro vamos a concluir que los *Vinos A, C y D* sufren un proceso de degradación del color a 50°C, dicha degradación se considera gradual en función del tiempo. Mientras que el *Vino E* sufre una degradación más acusada del color en torno a los 27 días de su almacenamiento. Cabe mencionar que el *Vino B* es el que se observa menos degradación a 50°C debido a la menor coloración inicial de este vino.

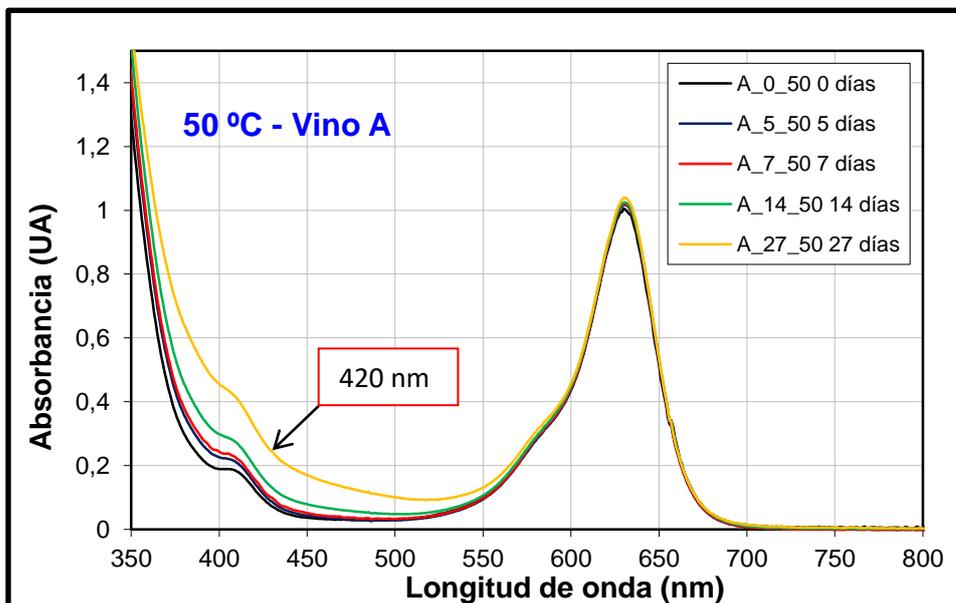
Los cambios de color reflejados en las bebidas alcohólicas se pueden visualizar en las variaciones de sus espectros de absorción en longitudes de onda cercanas a los 420 nm

**(VER FIGURAS 41-50)**



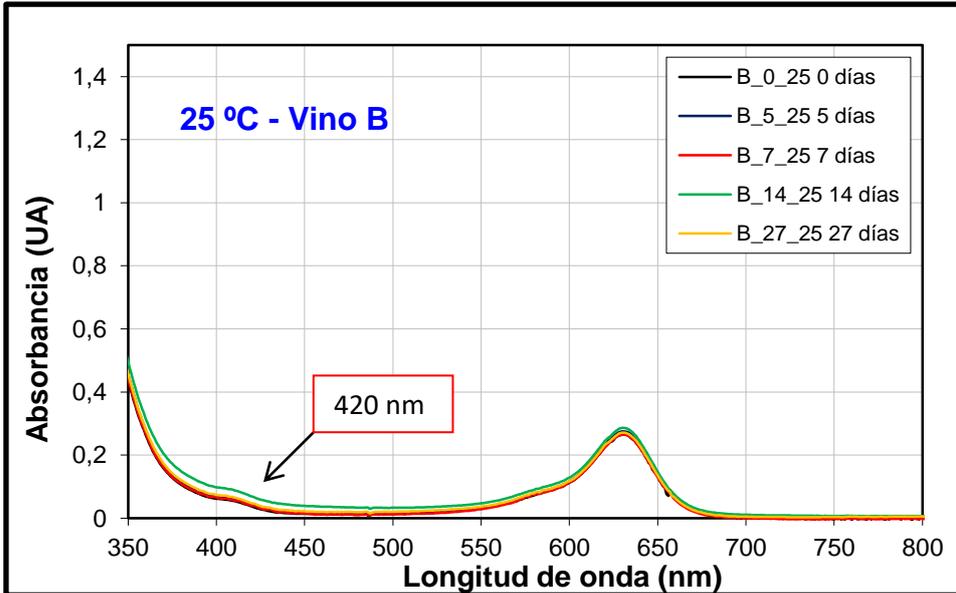
**FIGURA 41: Espectro de absorción del *Vino A* a 25°C**

Fuente: Espectrofotómetro



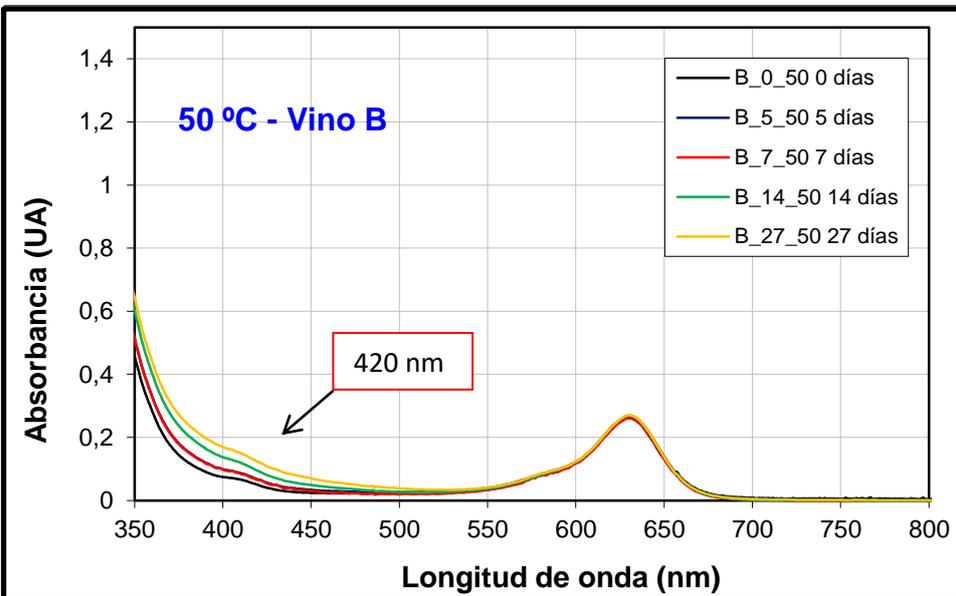
**FIGURA 42: Espectro de absorción del *Vino A* a 50°C**

Fuente: Espectrofotómetro



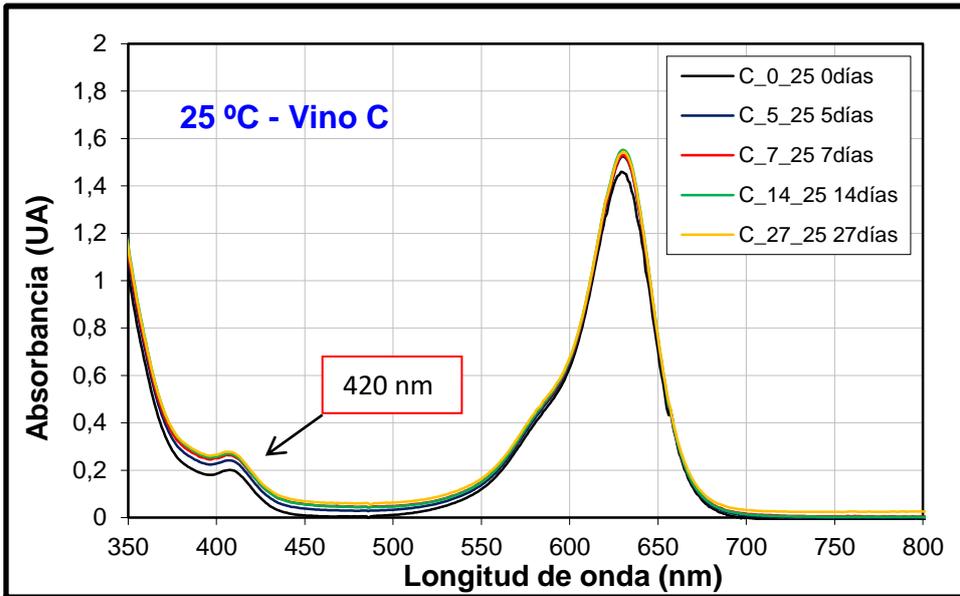
**FIGURA 43: Espectro de absorción del *Vino B* a 25°C**

Fuente: Espectrofotómetro



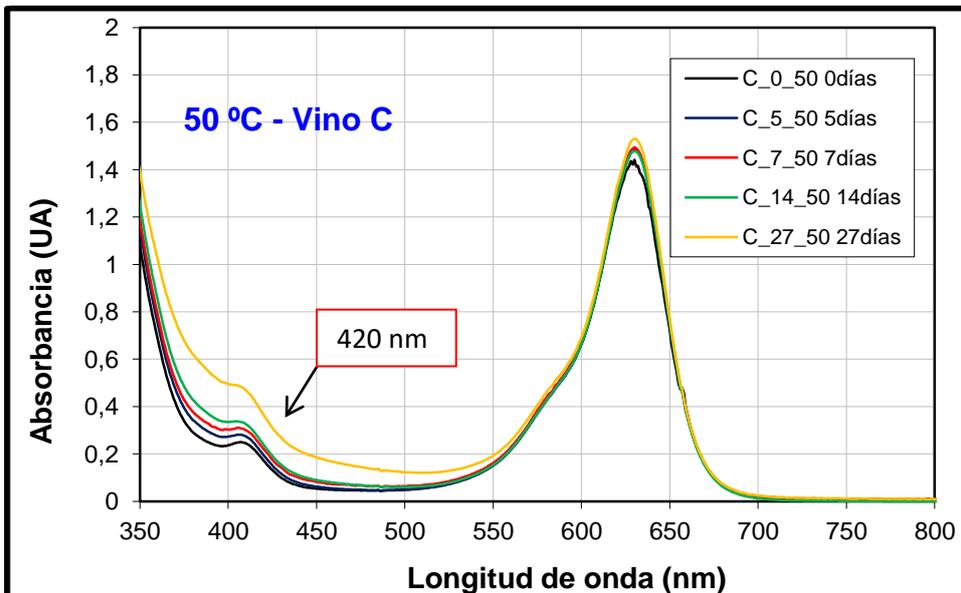
**FIGURA 44: Espectro de absorción del *Vino B* a 50°C**

Fuente: Espectrofotómetro



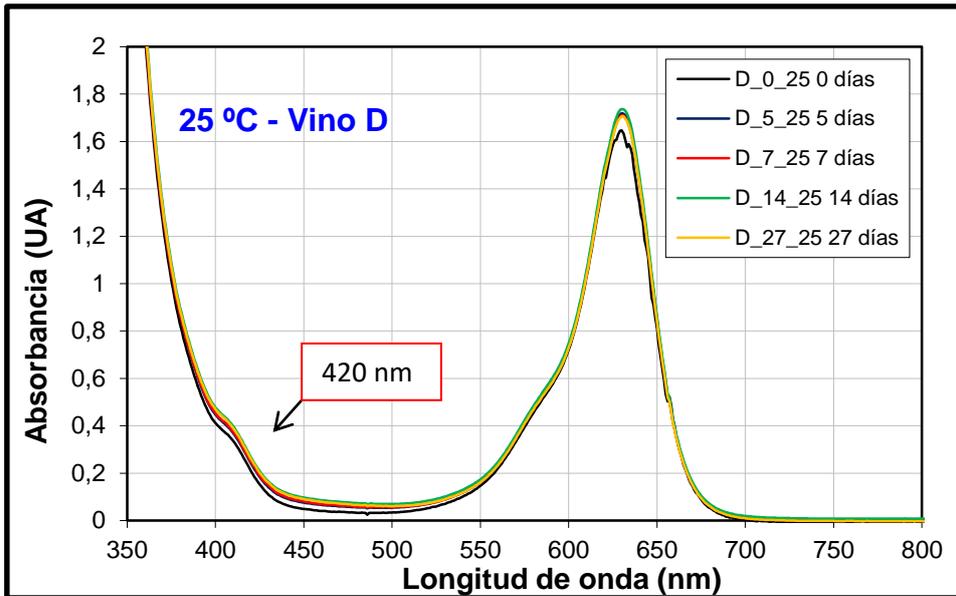
**FIGURA 45: Espectro de absorción del *Vino C* a 25°C**

Fuente: Espectrofotómetro



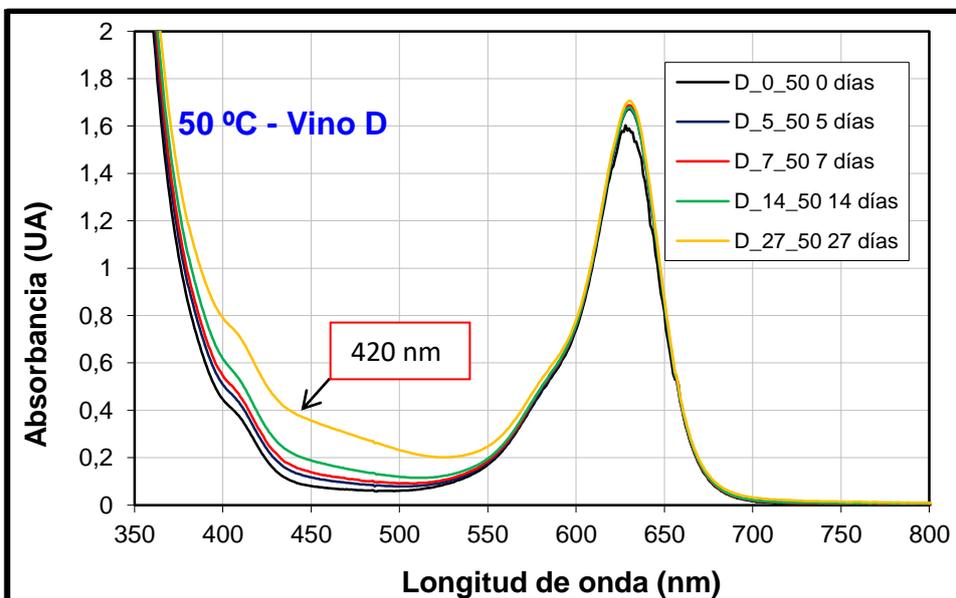
**FIGURA 46: Espectro de absorción del *Vino C* a 50°C**

Fuente: Espectrofotómetro



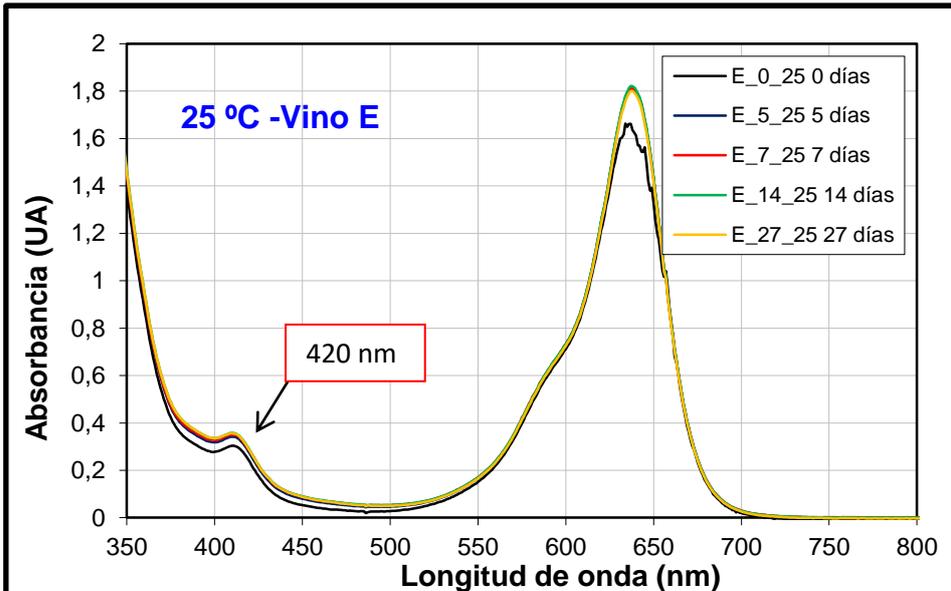
**FIGURA 47: Espectro de absorción del *Vino D* a 25°C**

Fuente: Espectrofotómetro



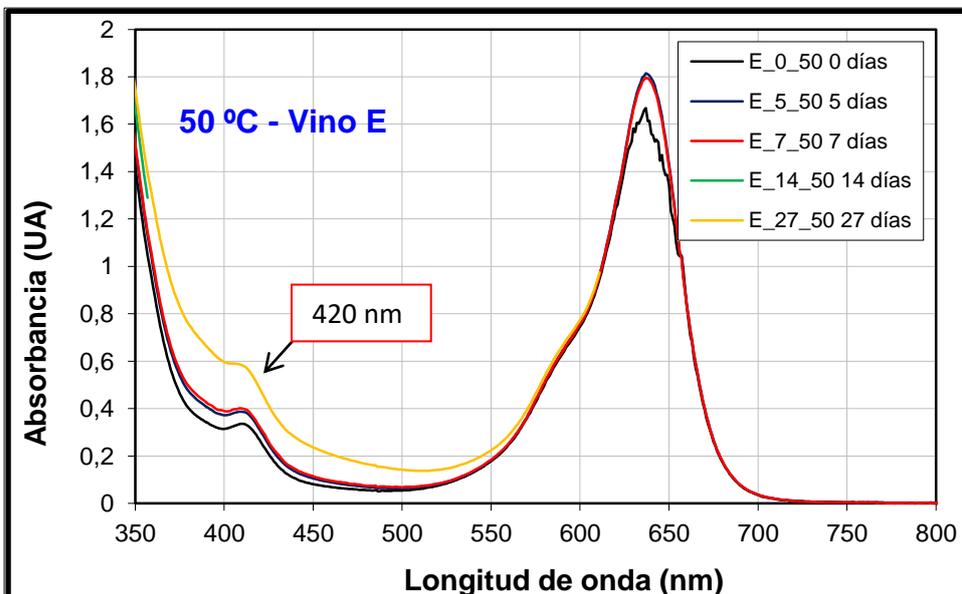
**FIGURA 48: Espectro de absorción del *Vino D* a 50°C**

Fuente: Espectrofotómetro



**FIGURA 49: Espectro de absorción del *Vino E* a 25°C**

Fuente: Espectrofotómetro



**FIGURA 50: Espectro de absorción del *Vino E* a 50°C**

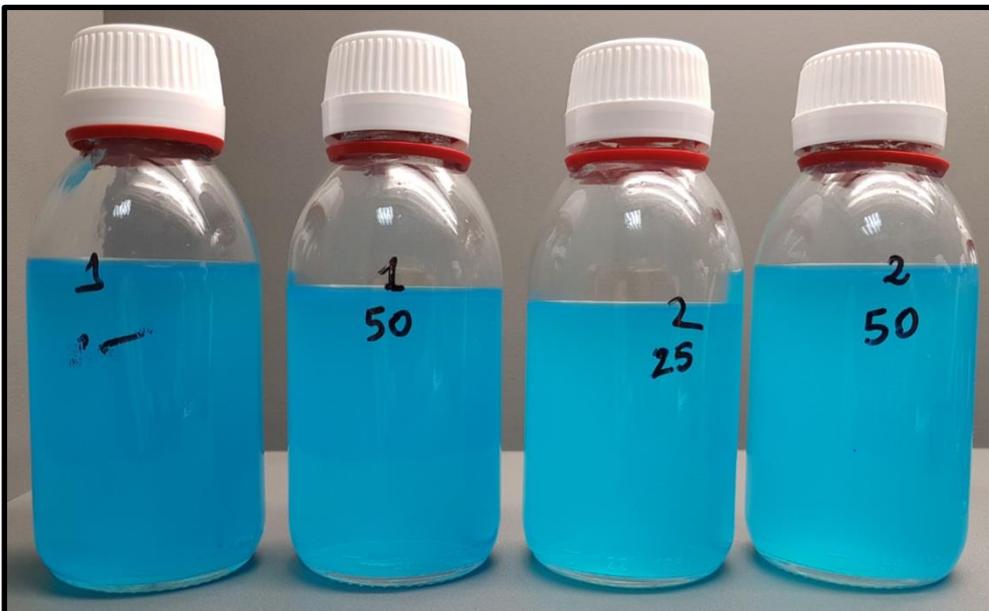
Fuente: Espectrofotómetro



#### 4.2.1.2. Ensayo de estabilidad de bebidas isotónicas

Las bebidas isotónicas que presentan el colorante E-133 en su composición son *Powerade Blue* y *Upgrade Blue*, las cuales se conservaron a 25 y 50 °C durante un periodo de 51 días.

Las bebidas estudiadas no presentaron ninguna anomalía en su color en todo el tiempo que fueron almacenadas en las estufas a las diferentes temperaturas. (VER FIGURA 51)



**FIGURA 51: Estabilidad de bebidas isotónicas a 25 y 50 °C (51 días)**

Fuente: Elaboración propia

Las características de estas bebidas es el hecho de poseer un pH de 3,5 y la presencia de ciertos compuestos en su composición, como son; la sacarosa, acelsufamo K, sucralosa, ácido cítrico, citrato sódico, goma arábica, etc.

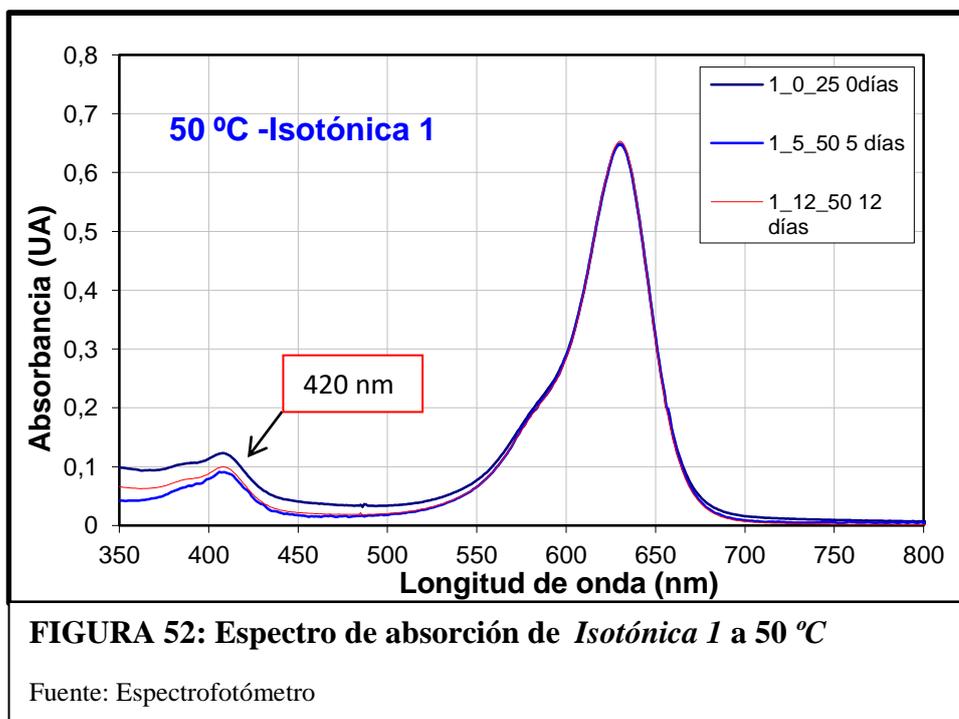
Tal como se realizó con los vinos, se tomaron diferentes muestras para analizarlas en el espectrofotómetro, dichas muestras fueron recogidas los días 0, 5 y 12. Estas muestras recogidas fueron estudiadas a temperaturas de 50 y 80°C.

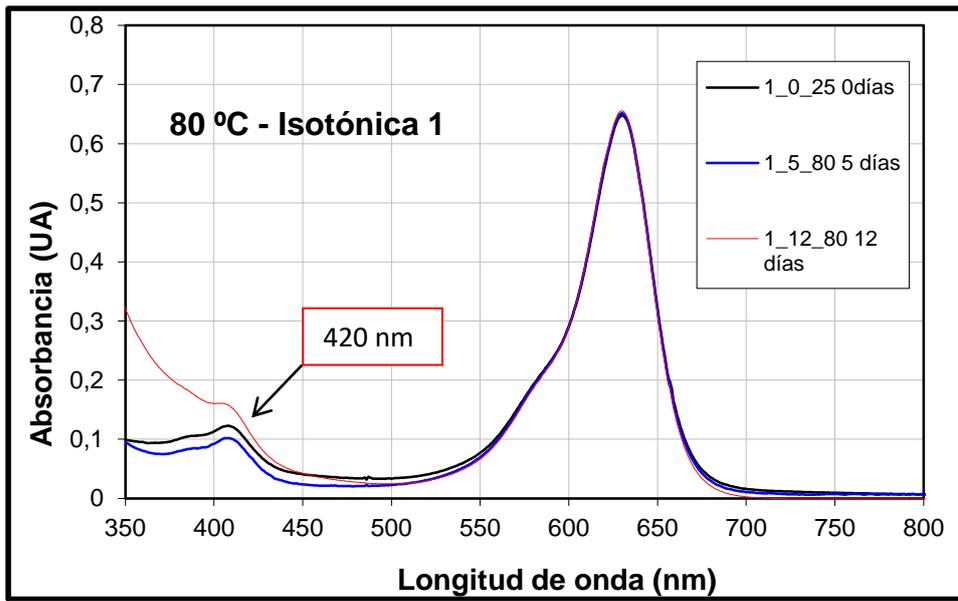


Debido a la turbidez que presentaban fueron filtradas antes de ser analizadas, para ello se usaron filtros de celulosa regenerada, ya que se consideran los filtros más efectivos para eliminar la turbidez sin llegar a retener el colorante azul. La turbidez se debe eliminar ya que podría afectar a la hora de obtener los espectros de absorción de las bebidas.

De los análisis realizados mediante el espectrofotómetro se puede afirmar que existen pequeñas variaciones a temperaturas de 50 y 80°C. Dichas degradaciones se presentan en ambas bebidas. Cabe mencionar que desde el punto de vista del color, no existen cambios apreciables.

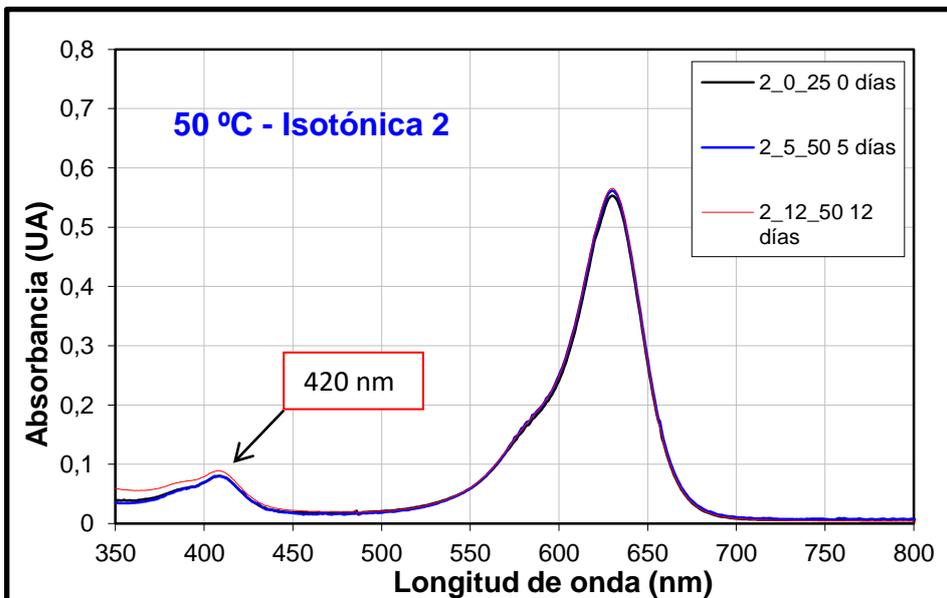
Estas degradaciones observadas en el espectro de absorción se reflejan en longitudes de onda cercanas a los 420 nm. Aun así estas pequeñas degradaciones no se detectaron a simple vista en las bebidas isotónicas los 3 meses que estuvieron almacenadas en las estufas. (VER FIGURAS 52-55)





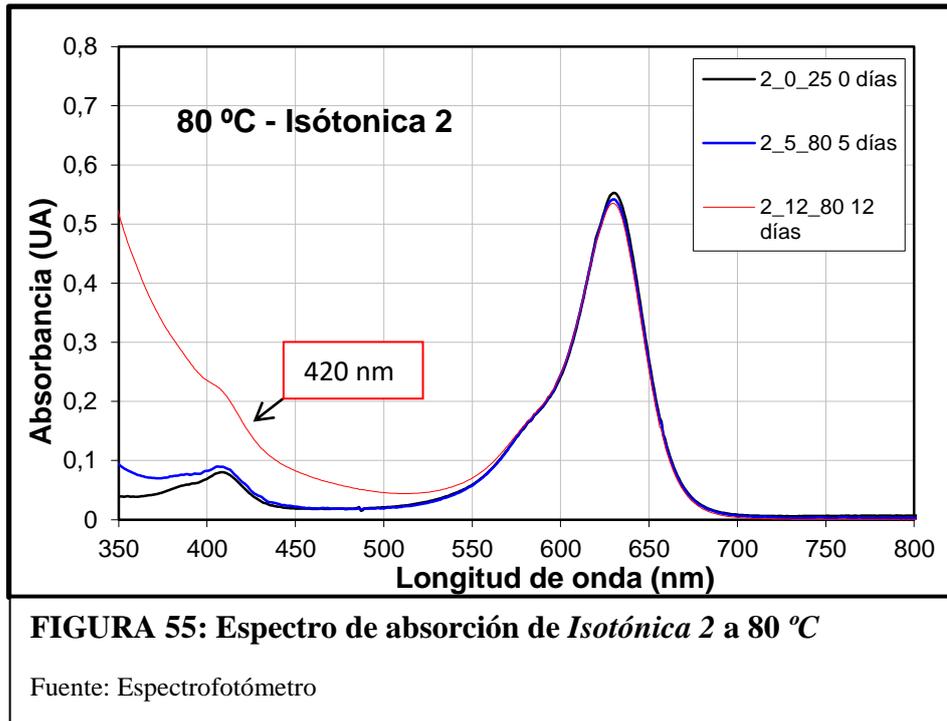
**FIGURA 53: Espectro de absorción de *Isotónica 1* a 80 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



**FIGURA 54: Espectro de absorción de *Isotónica 2* a 50 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



#### 4.2.1.3. Ensayo de estabilidad de bebidas refrescantes con zumo de frutas

Las bebidas refrescantes con zumo de frutas que se trataron en este experimento fueron *Sunny Delight Blue* y *Fusión Frutas*, las cuales están formuladas con el colorante E-133. Al igual que se realizó con las bebidas isotónicas, estas bebidas se almacenaron unos 51 días a temperaturas de 25 y 50°C.

Pero a diferencia de las bebidas isotónicas, las bebidas con zumo de frutas sí presentaron anomalías en su color durante el almacenamiento. Las principales características de su formulación son; un pH relativamente bajo, ya que la *bebida refrescante con zumo 1* contiene un pH de 2,95, y la otra posee un pH de 3,10, mientras que las bebidas isotónicas poseían un pH en torno a 3,5. La *bebida refrescante con zumo 1* posee extractos de cítricos en su composición, (naranja 3,8%, mandarina 0,5%, pomelo 0,5% y limón 0,1%) que podrían provocar el cambio de color en la bebida, mientras que la *bebida refrescante con*



zumo 2 posee un 35% de zumo de frutas (20% de manzana, 10% de uva, 1% de arandanos y 1% de kiwi). La composición de cada bebida fue la principal razón por la cual la *bebida con zumo 1* si cambio de color a 50°C, mientras que la *bebida refrescante con zumo 2* no lo hizo. (VER FIGURA 56)



**FIGURA 56: Estabilidad de bebidas con zumo de frutas a 25 y 50°C (51días)**

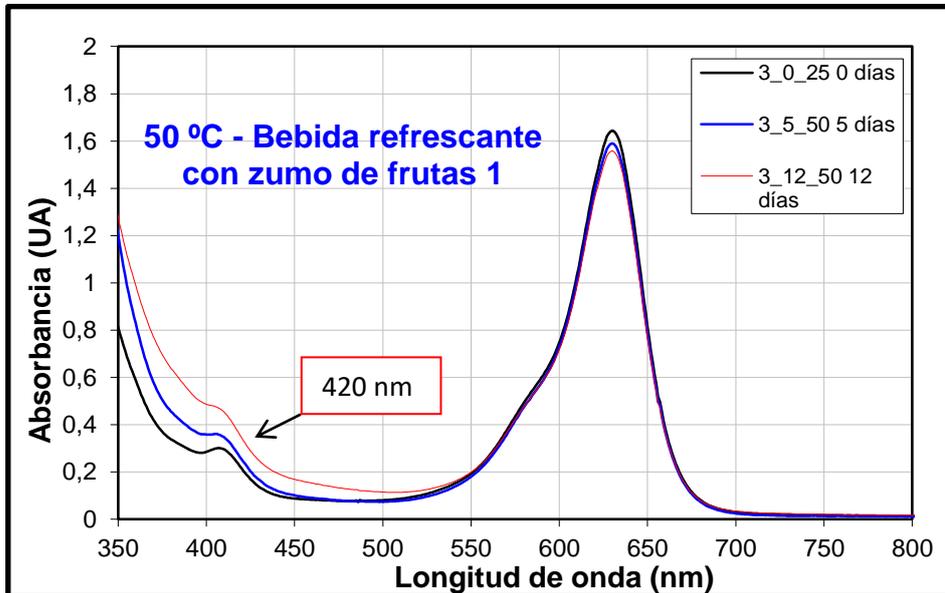
Fuente: Elaboración propia

Estas bebidas también se consideran turbias con lo cual se tuvieron que filtrar con filtro de celulosa regenerada antes de introducir las muestras en el espectrofotómetro. En este experimento las muestras se recogieron los mismos días que las bebidas isotónicas, es decir, los días 0,5 y 12, tras almacenamiento a 50 y 80°C.

Tras los análisis realizados en el espectrofotómetro se llegó a la conclusión de que ambas bebidas refrescantes con zumo de frutas sufren importantes degradaciones del color a 80°C, mientras que a 50°C los cambios de color tras 12 días no fueron tan evidentes, especialmente en el caso de la *Bebida refrescante con zumo de frutas 2*. Estos cambios se reflejaron en sus espectros de absorción en la región de los 420 nm. Cabe destacar que se

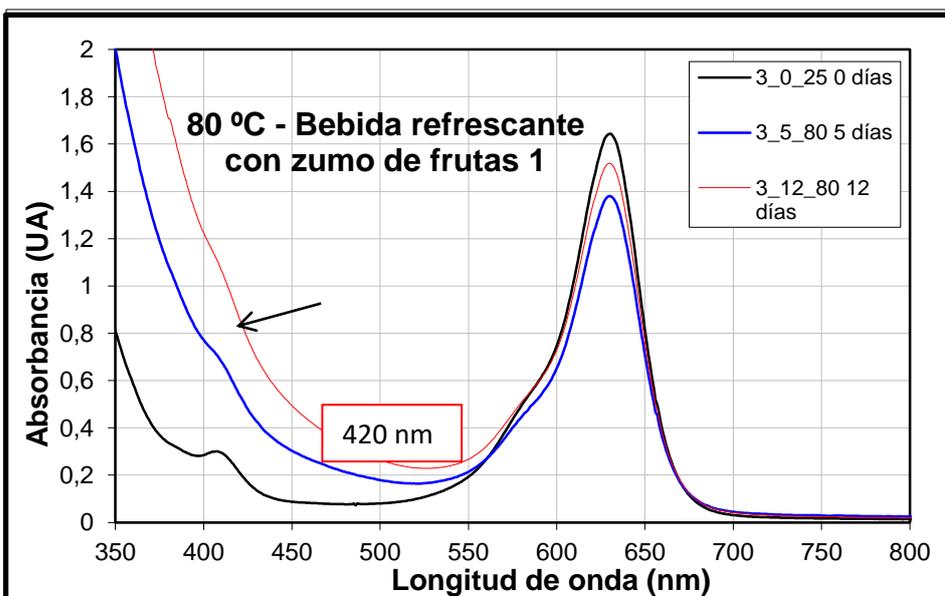


observa un mayor cambio de tonalidad de azul a simple vista en la primera bebida que en la segunda. (VER FIGURAS 57-60)



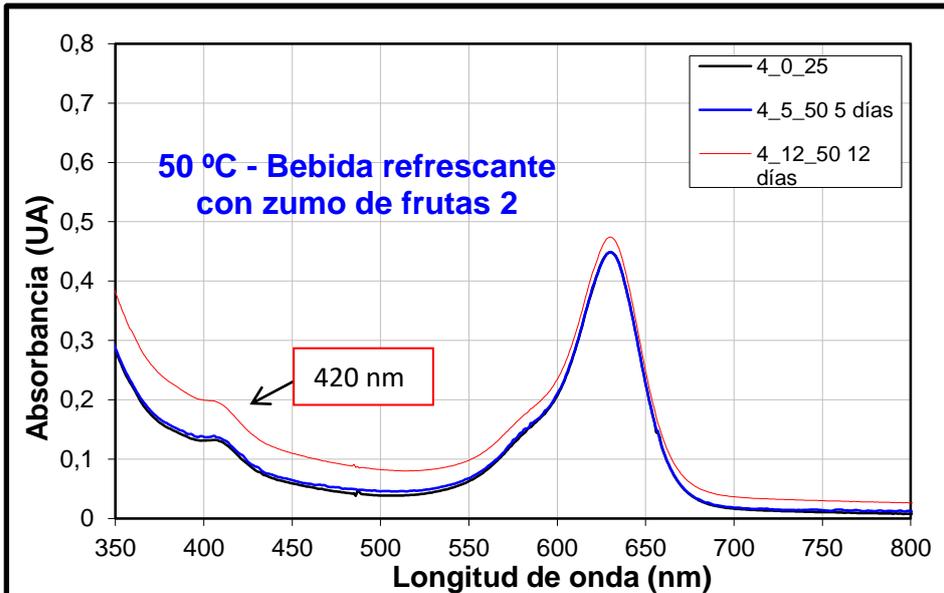
**FIGURA 57: Espectro de absorción de bebida refrescante con zumo de frutas 1 a 50 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



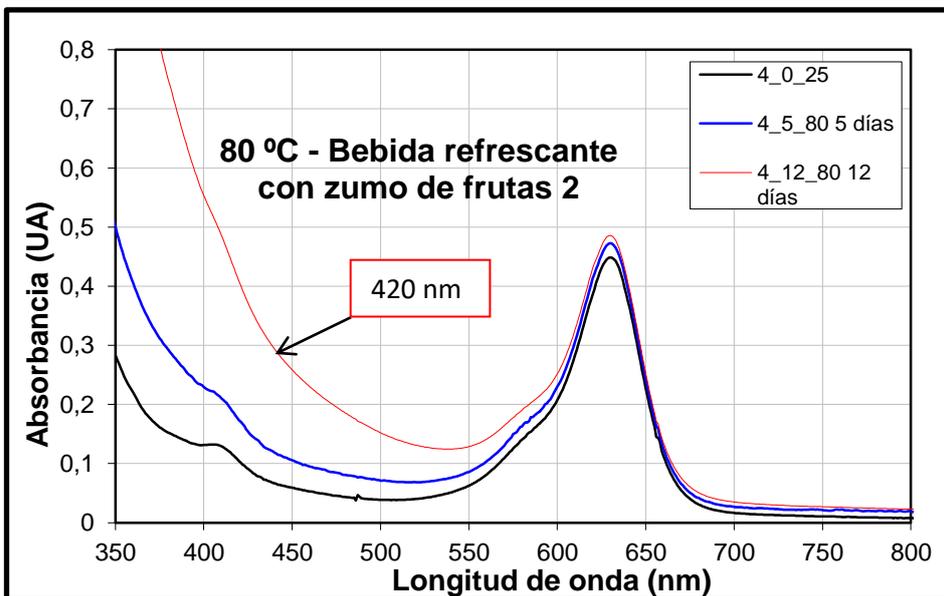
**FIGURA 58: Espectro de absorción de bebida refrescante con zumo de frutas 1 a 80 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



**FIGURA 59: Espectro de absorción de bebida refrescante con zumo de frutas 2 a 50 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



**FIGURA 60: Espectro de absorción de bebida refrescante con zumo de frutas 2 a 80 °C**

Fuente: Espectrofotómetro

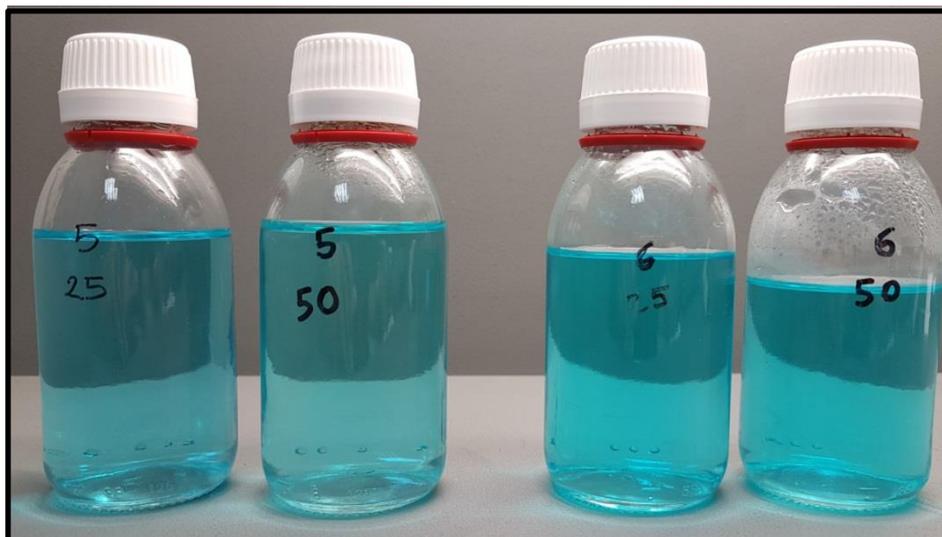


#### 4.2.1.4. Ensayo de estabilidad de tónicas

Las tónicas que se utilizaron para este experimento fueron *Nordic Tonic Blue* y *Original Premium Tonic*, las cuales también contienen el colorante E-133 en su composición. Como sucedió con las bebidas refrescantes con zumo de frutas y con las bebidas isotónicas, estas bebidas también se conservaron a las mismas temperaturas y el mismo tiempo estimado.

Estos tipos de tónicas no presentaron ningún tipo de alteración del color a temperaturas de 25 y 50°C durante 51 días. No obstante se observó un cambio de tonalidad del azul característico de las tónicas a un azul verdoso a temperaturas de 80°C. Las propiedades que contienen las tónicas que podrían ocasionar que verdeen dichas bebidas son; la presencia de aromas cítricos tales como esencia de limón, lima e incluso pomelo. Al igual que ocurre con las bebidas refrescantes con zumo de frutas, estas bebidas poseen un pH ácido en torno a 2,44 lo que puede facilitar el proceso de degradación del colorante E-133.

(VER FIGURA 61)



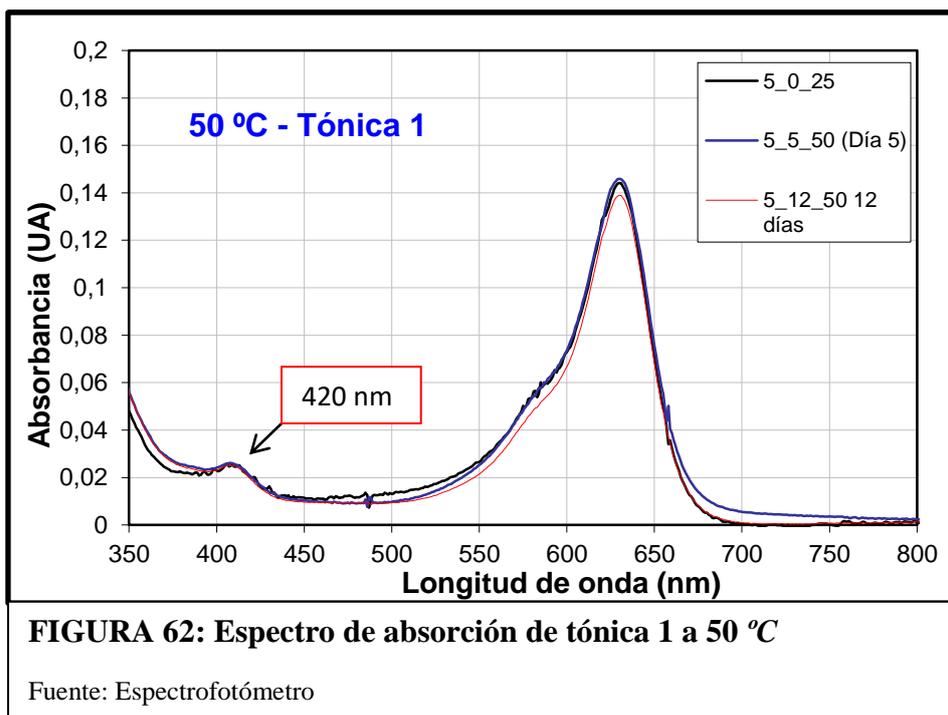
**FIGURA 61: Estabilidad de tónicas a 25 y 50°C (51 días)**

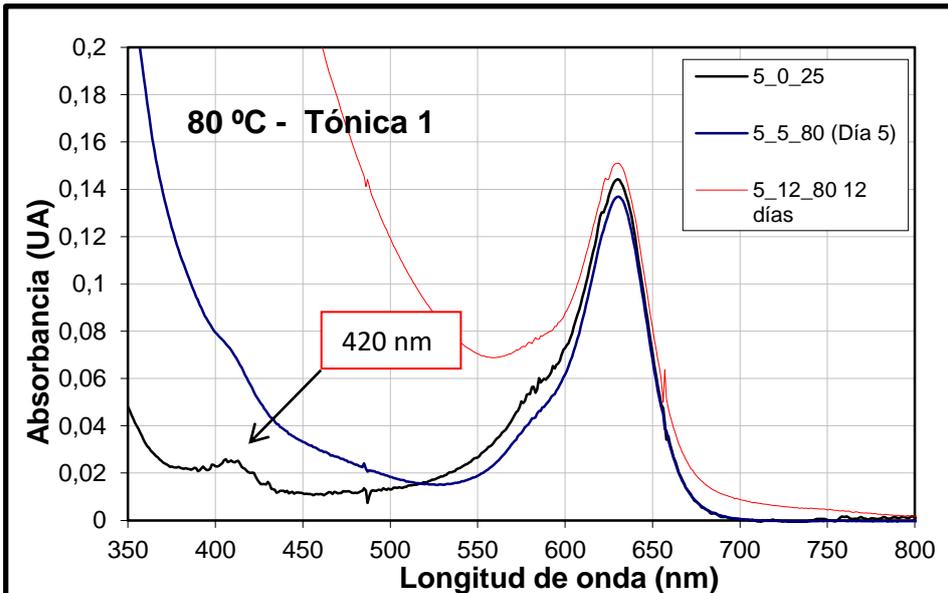
Fuente: Elaboración propia



Las tónicas no presentaban turbidez, con lo cual las muestras podían introducirse directamente en el espectrofotómetro sin necesidad de un filtrado. Las muestras se sacarán de las estufas los mismos días que las anteriores bebidas sin alcohol, a los 0, 5 y 12 días a 50 y 80°C.

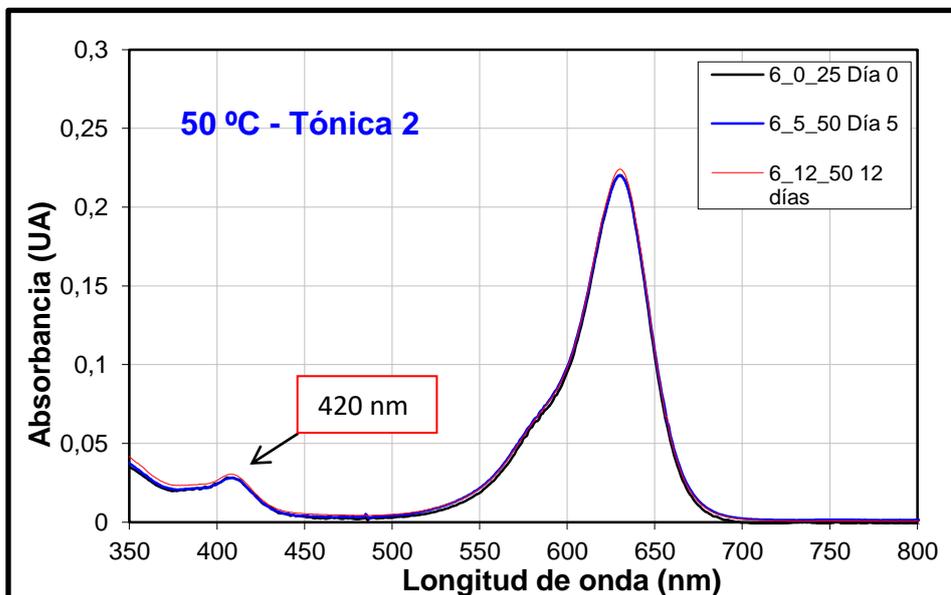
Cabe mencionar que en los espectros de absorción de estas bebidas podemos contemplar que no existe apenas degradación a temperaturas de 50°C, mientras que a temperaturas de 80°C se presentaron degradaciones del colorante de ambas tónicas en toda la región del espectro visible. (VER FIGURAS 62-65)





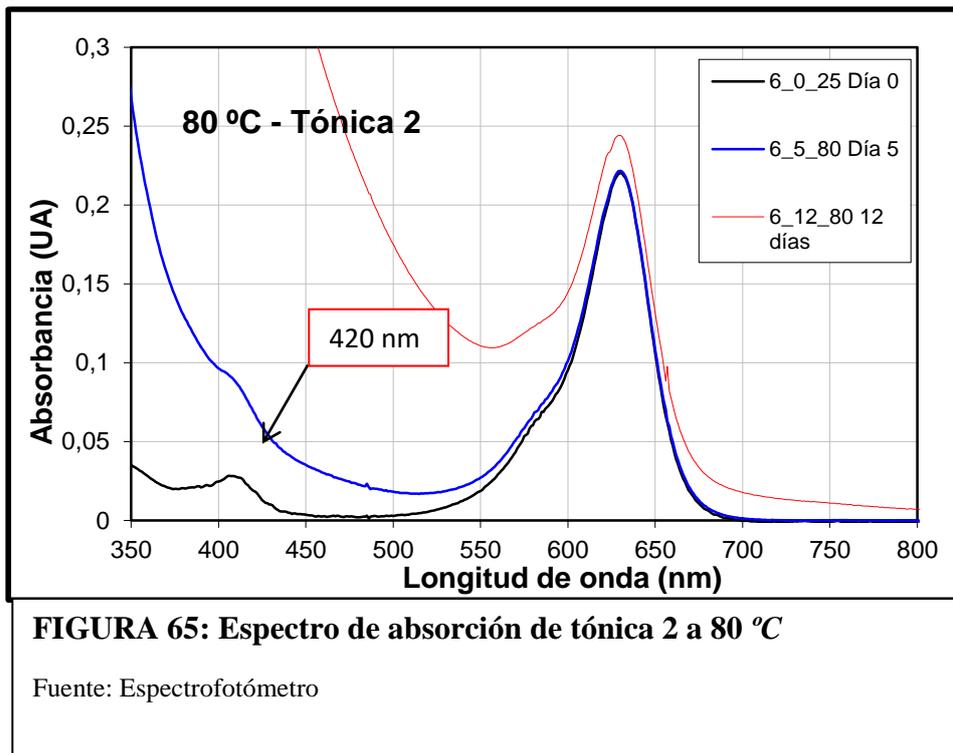
**FIGURA 63: Espectro de absorción de tónica 1 a 80 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



**FIGURA 64: Espectro de absorción de tónica 2 a 50 °C**

Fuente: Espectrofotómetro



Podemos concluir que a 25°C ninguna bebida comercial azul sufrió alteraciones de su color.

Los experimentos realizados en las bebidas azules comerciales atendiendo al almacenamiento a 50 °C, permitieron observar que los vinos verdearon transcurridos unos 17 días, mientras que las bebidas isotónicas y las tónicas no verdearon con ese tiempo y a esa temperatura. Lo que indica que algún compuesto puede ser responsable del fenómeno de verdeamiento.

En lo que respecta a las bebidas refrescantes formuladas con zumo de frutas, podemos indicar que aquellas que contienen cítricos en su composición (bebida refrescante con zumo de frutas 1) a 50°C tras unos 12 días sufrieron una degradación de su color azul, mientras que la que se preparó con otro tipo de frutas como la uva, (bebida refrescante con zumo de frutas 2) mostró menores cambios de color. Esto parece indicar que existe una relación entre la presencia de zumos cítricos y de uva en el cambio de color.



A 80°C las bebidas isotónicas estudiadas no presentaron alteraciones del color azul, mientras que las tónicas tras 12 días cambiaron su tonalidad azul a un color más verdoso. Las bebidas refrescantes con zumo de frutas en su composición presentaron una mayor degradación del color azul a 80°C transcurridos 12 días. **(VER FIGURA 66)**



**FIGURA 66: Estabilidad de bebidas sin alcohol a 80°C**

Fuente: Elaboración propia



#### 4.2.1. Experimento de estabilidad con bebidas modelo azules

El experimento sobre la estabilidad del colorante E-133 en ciertas bebidas modelo azules se basa en el estudio de su degradación utilizando una concentración de colorante constante en absorbancia 1, y utilizando distintos tipos de bebidas de variada composición química entre otras características principales.

Las bebidas modelo que han sido objeto de este experimento han sido; *Soda Schweppes* que es una bebida con un pH en torno a 3,9 y contiene anhídrido carbónico y bicarbonato sódico como principales componentes. A esta soda se le adiciono el colorante E-133 y también se le disminuyó el pH hasta niveles de 2,5-3,0.

También se utilizó la bebida *Upgrade Blue*, a la cual se le adiciono el colorante *Azul Brillante FCF* y tenía un pH de 3,5.

Para estudiar la influencia del colorante E-133 en diferentes tónicas, también fueron objetos de estudio *Nordic Tonic Blue* y *Nordic Tonic Water*. Estas últimas bebidas aparte de contener dióxido de carbono, contienen quinina y ácido cítrico en su composición química. Además ambas bebidas poseen un pH de 2,5 y se suplementaron con E-133.

Por último se estudió la estabilidad del colorante en *el Vino B*. Este vino presentaba un pH en torno a 3,0 y se le adiciono E-133.

Este experimento consistió en la degradación acelerada de dichas bebidas, manteniendo las bebidas sin alcohol a una temperatura de 80°C mientras que el vino se conservó a unos 50°C.

Se ensayaron tanto las bebidas con colorantes en su composición como las bebidas sin colorantes.



#### 4.2.1.5. Ajuste de pH.

El primer paso que se llevó a cabo en este experimento fue ajustar el pH de las bebidas mediante el uso de disoluciones de ácido cítrico, disoluciones de hidróxido de sodio o incluso disoluciones de hidrógenocarbonato de sodio

Se corrigió el pH de la bebida *Soda Schweppes* de un pH inicial de 3,9 hasta un pH de 2,5. Para ello se adiciono ácido cítrico en disolución para disminuir su valor.

El fundamento de ajustar el pH se utilizó para observar la degradación del colorante en las bebidas y comprobar si la acidez de estas influye en cierta medida en dicho proceso.

#### 4.2.1.6. Adición de colorante E-133.

Según la ley de Beer Lambert se demuestra que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de colorante presente en la bebida a través de la siguiente formula:

$$A = \varepsilon * l * c$$

Donde  $\varepsilon$  es la *absortividad molar*, que se considera un valor constante para cada tipo de sustancia a una determinada longitud de onda y en unas condiciones experimentales determinadas; también se denomina *coeficiente de extinción molar* si la concentración se expresa en moles por litro.

Si se trabaja a una longitud de onda dada y con una cubeta de un determinado *espesor*,  $l$ , la *absorbancia*,  $A$ , es proporcional a la *concentración de la muestra*,  $c$ , lo que constituye el fundamento del análisis espectrofotométrico cuantitativo.



Gracias a esta ley se puede asociar la absorbancia de las diferentes bebidas con la concentración de colorante suministrado. [24]

Por esta razón se adicionó una concentración de E-133 tal que la absorbancia alcanzada en todas las bebidas fuese próxima a la unidad.

El objetivo que se intentó conseguir se basó en establecer una concentración de E-133 más o menos equitativa en todas las bebidas para poder observar el proceso de degradación del colorante en cada una de las bebidas.

En caso de que la degradación se hubiese presentado de la misma forma en todas las bebidas quedaría demostrado que la degradación del colorante E-133 está directamente relacionada a su concentración presente en la bebida no viene afectada por las características de las bebidas. Sin embargo, la degradación del colorante no se presentó de manera uniforme, lo que llevo a pensar que había otros factores que también influían en el proceso de degradación del colorante y/o cambio de tonalidades de azul a verde.

#### ***4.2.1.7. Estabilidad de colorantes frente a la temperatura.***

El experimento consistió en introducir las bebidas en estufas a 50 y 80°C durante un periodo de tiempo característico para cada tipo de bebida. Los vinos se almacenaron 29 días a 50°C, mientras que el resto de bebidas sin alcohol solamente se guardaron 10 días a 80°C.

Se realizaron análisis mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficacia para observar tanto la degradación del colorante E-133 a concentraciones similares, como para contemplar la propia degradación de los compuestos químicos presentes en las bebidas en las cuales no se ha adicionado E-133.



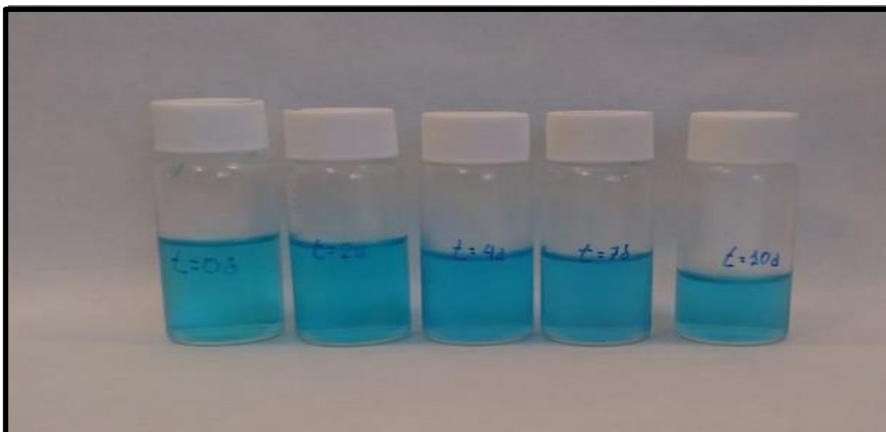
La *Soda Schwepees* con E-133, no sufre ningún tipo de alteración durante su almacenamiento. La *Soda Schwepees* sin el colorante E-133 queda transparente tras el almacenamiento. (**VER FIGURA 67**)



**FIGURA 67: Estabilidad de *Soda Schwepees* a 80°C**

Fuente: Elaboración propia

La bebida *Upgrade Blue* como se demostró anteriormente tampoco sufre alteraciones del colorante E-133 a una temperatura de 80°C, con lo cual su color se mantiene uniforme independientemente de la concentración de colorante añadido a la bebida (**VER FIGURA 68**)

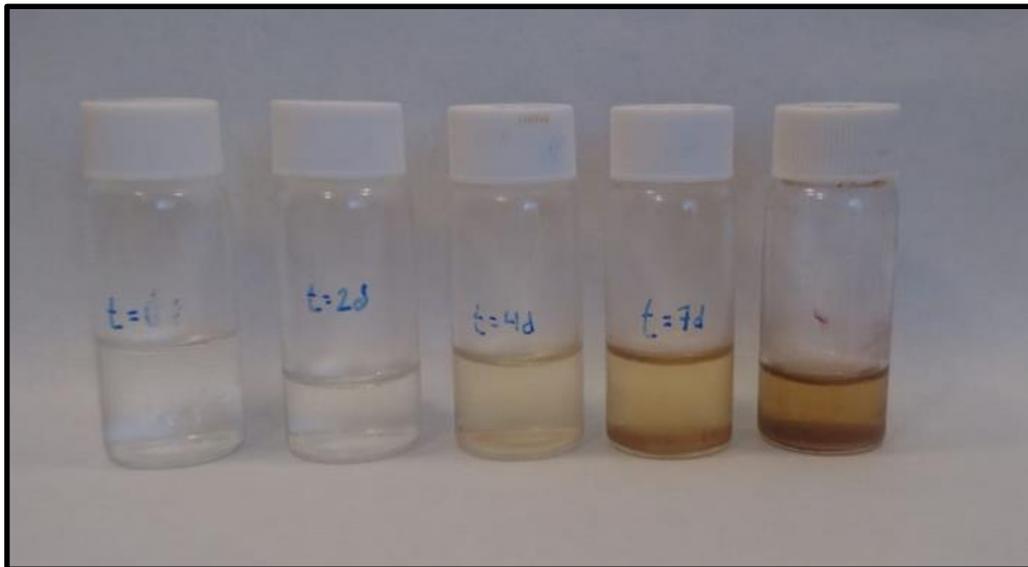


**FIGURA 68: Estabilidad de *Upgrade Blue* a 80°C**

Fuente: Elaboración propia



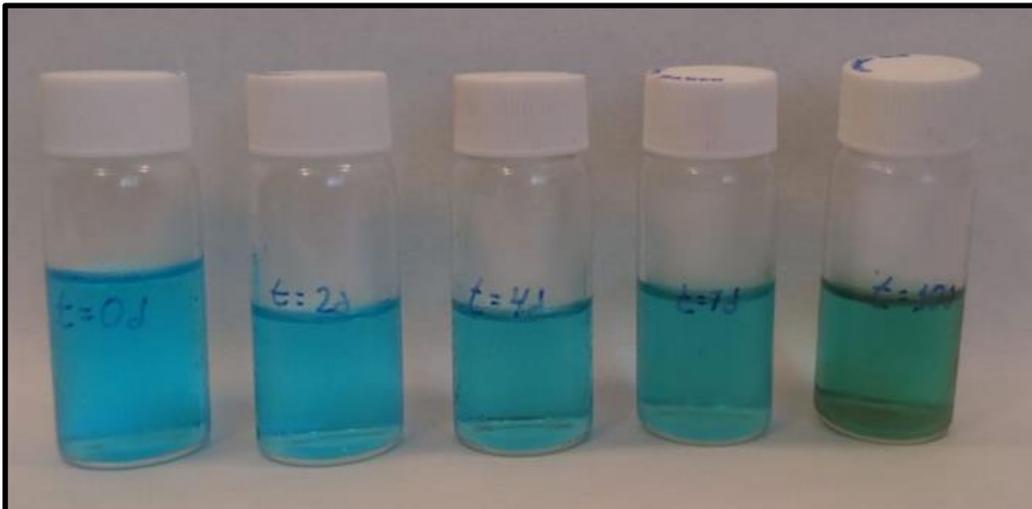
La bebida *Nordic Tonic Water* al calentarse sin colorante se pone de color amarillo, esto es un claro ejemplo de que aparecen compuestos amarillos que provienen posiblemente de la oxidación de los compuestos fenólicos y que provocan que la bebida verdee en presencia del colorante E-133, puesto que sin poseer el colorante E-133, la bebida con el paso del tiempo empieza a mostrarse amarilla gracias a la acción de reacciones químicas en su interior. **(VER FIGURA 69).**



**FIGURA 69:** Estabilidad de *Nordic Tonic Water* a 80°C

Fuente: Elaboración propia

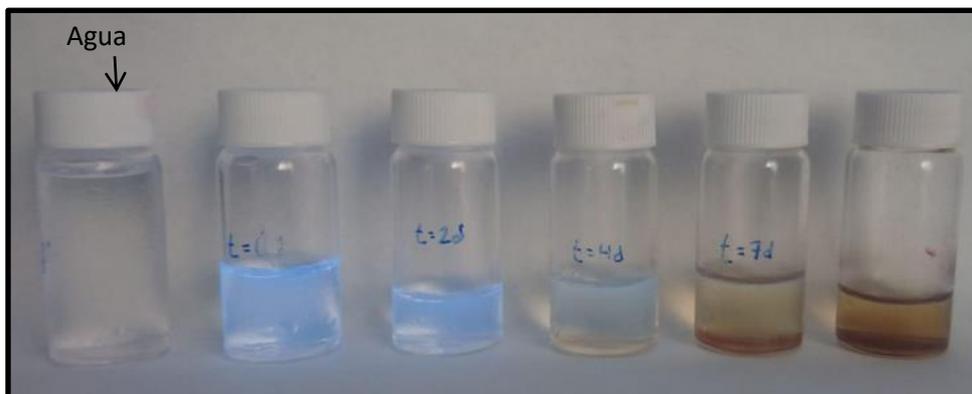
La bebida *Nordic Tonic Blue*, que si contiene el colorante E-133, se vuelve de un color más verdoso, debido a que el color amarillo más el azul del colorante provocan un tono verde característico **(VER FIGURA 70)**



**FIGURA 70: Estabilidad de *Nordic Tonic Blue* a 80°C**

Fuente: Elaboración propia

En este contexto se puede puntualizar que la bebida *Nordic Tonic Water* presenta fluorescencia, gracias a la presencia de quinina en su estructura. (VER FIGURA 73)



**FIGURA 73: Fluorescencia de *Nordic Tonic Water***

Fuente: Elaboración propia

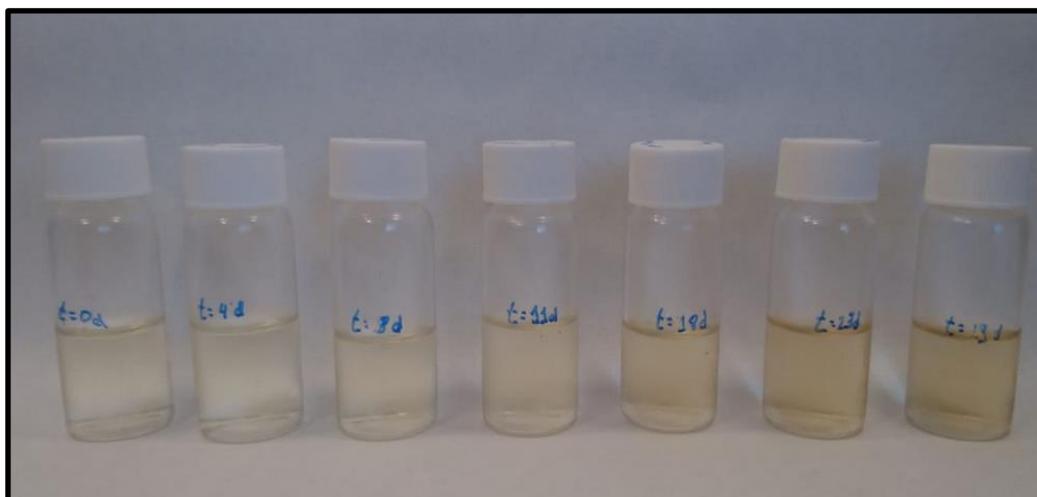
La fluorescencia se produce cuando una sustancia emite luz visible al absorber radiación de una longitud de onda menor, como por ejemplo luz ultravioleta. La diferencia entre la energía absorbida (del fotón ultravioleta) y la emitida (del fotón visible) se disipa en forma de calor. Se dice que la sustancia posee fluorescencia cuando este proceso es muy rápido; si es más lento se dice que la sustancia posee fosforescencia.



Según O'Reilly; la quinina es una molécula orgánica de fórmula molecular  $C_{20}H_{24}N_2O_2$ , en la que se puede observar el fenómeno de fluorescencia cuando ésta se ilumina con luz ultravioleta y se encuentra en medio ácido, como en el agua tónica. [25]

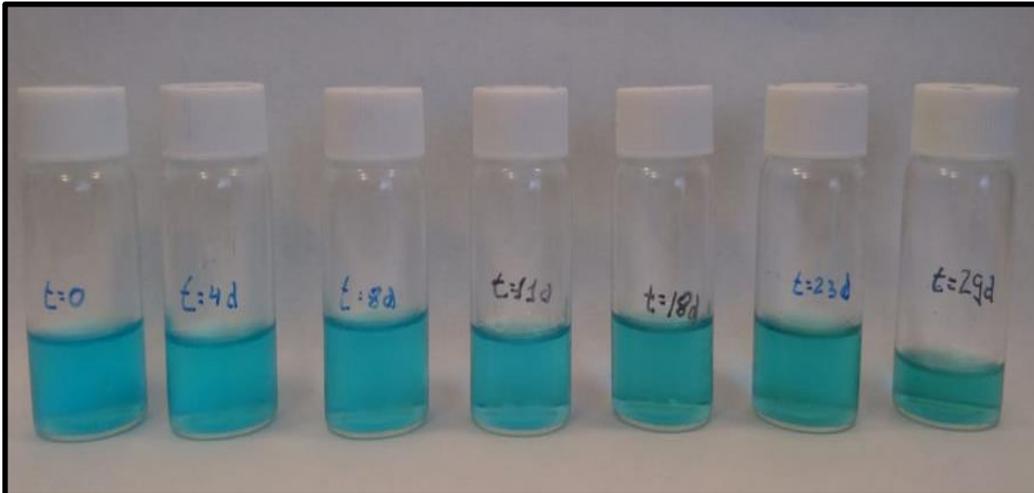
Como se observa en la fotografía las muestras a tiempo 0 y 2 días muestran una clara fluorescencia, mientras que la muestra a los 4 días posee menos fluorescencia. A falta de una comprobación analítica la quinina puede ser en parte responsable del verdeamiento de las tónicas a altas temperaturas.

El *Vino B* sin colorante azul, tal y como sucede con la tónica presentó tras el calentamiento a  $50^{\circ}C$  compuestos amarillos procedentes posiblemente de la oxidación de compuestos fenólicos que provocan su amarilleamiento sin necesidad de poseer el colorante E-133. Con lo cual el vino al cual si se le ha adicionado dicho colorante, al transcurrir unos días poseerá un color verdoso. (**VER FIGURAS 71 Y 72**)



**FIGURA 71: Estabilidad de *Vino B* sin E-133 a  $50^{\circ}C$**

Fuente: Elaboración propia



**FIGURA 72: Estabilidad de *Vino B* a 50°C**

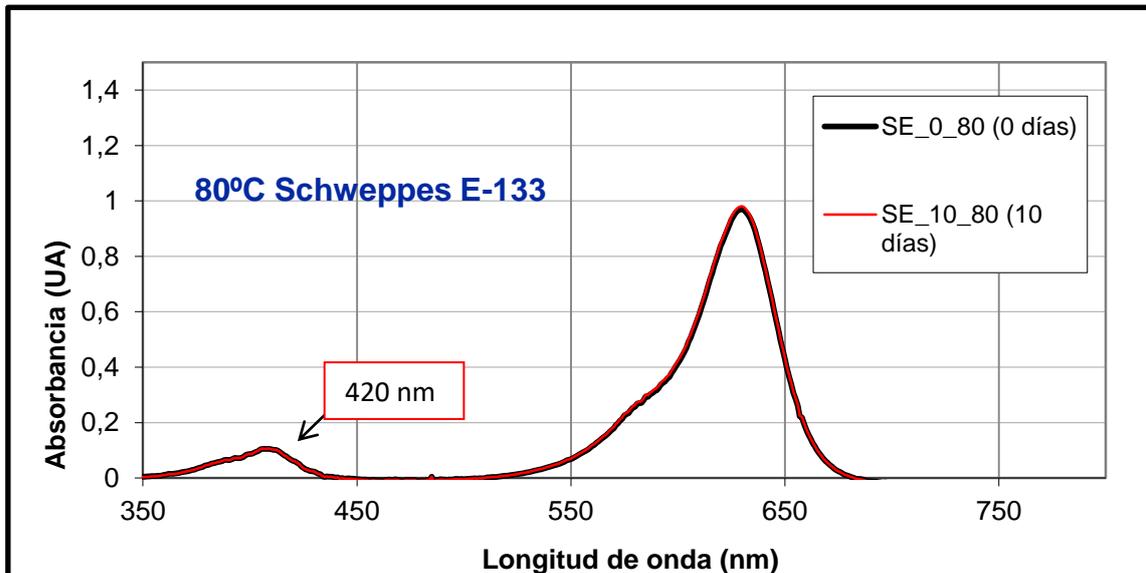
Fuente: Elaboración propia

Los estudios realizados en estas bebidas nos llevan a justificar que el cambio de color de las bebidas con colorante viene determinada por compuestos presentes en las bebidas que facilitan dicho proceso. Esto se explica gracias a que la bebida *Soda Schweppes* es una soda carbonatada sin ningún aditivo incorporado y no sufre ningún tipo de alteración del color tras almacenarse en las estufas a 80 °C.

#### **4.2.1.8. Espectrofotometría de las bebidas modelo.**

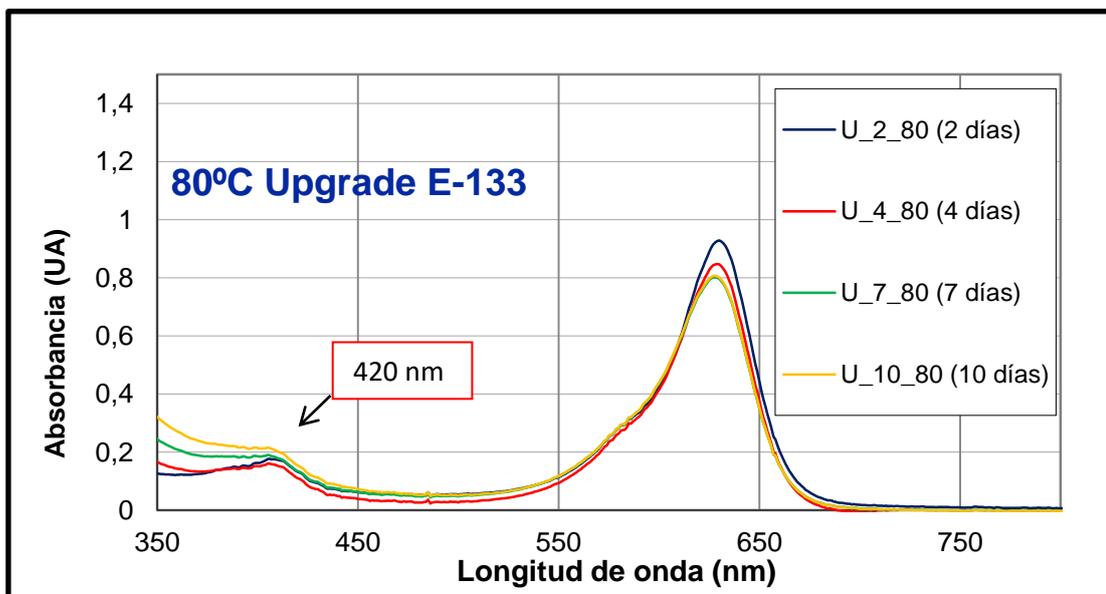
De las estufas a 50 °C se sacaron muestras de las bebidas alcohólicas para analizarlas, los días 0, 4, 8, 11, 18 y 29, mientras que las muestras tomadas de los refrescos fueron los días 0, 2, 4, 7 y 10 a 80°C.

De los espectros de absorción podemos concluir que las bebidas que menos variación de color sufren son *Soda Schweppes* con E-133y *Upgrade Blue*. No se observa el cambio visualmente de manera apreciable. **(VER FIGURAS 74 Y 75).**



**FIGURA 74:** Espectro de absorción de *Soda Schweppes* con adición de E-133 a 80°C

Fuente: Espectrofotómetro

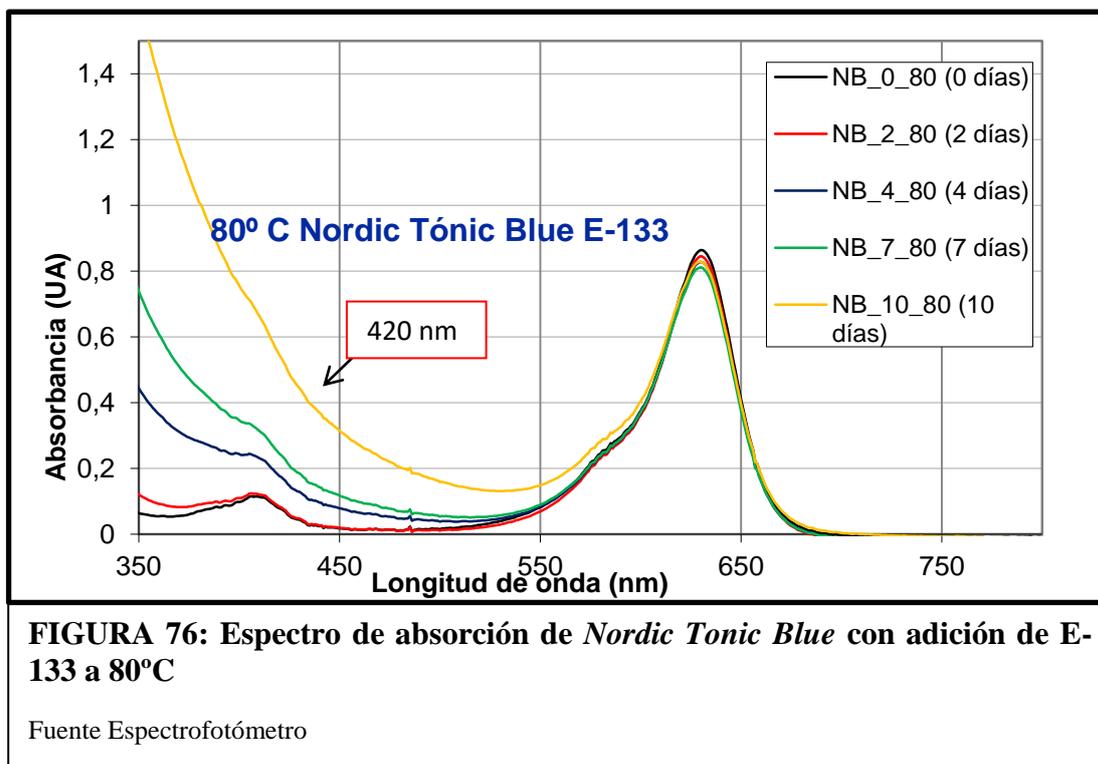


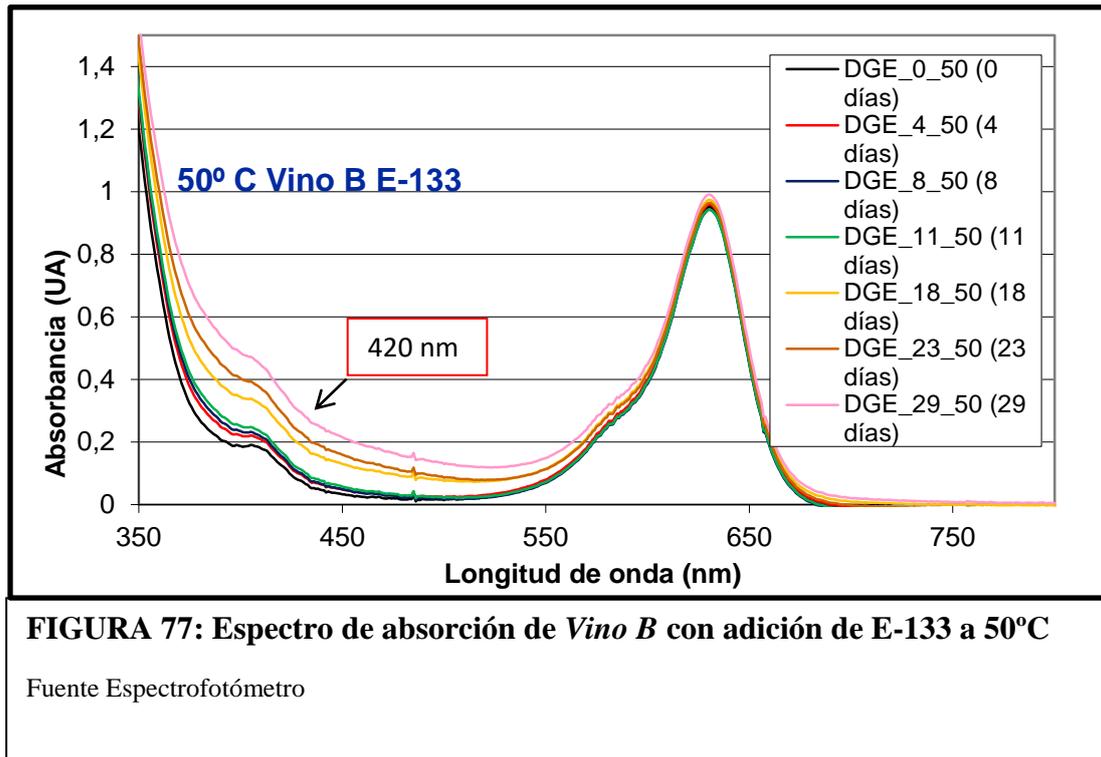
**FIGURA 75:** Espectro de absorción de *Upgrade Blue* con adición de E-133 a 80°C

Fuente Espectrofotómetro



Mientras que el *Vino B* y *Nordic Tonic Blue* son las bebidas que más alteración sufren del E-133 (VER FIGURAS 76 Y 77)

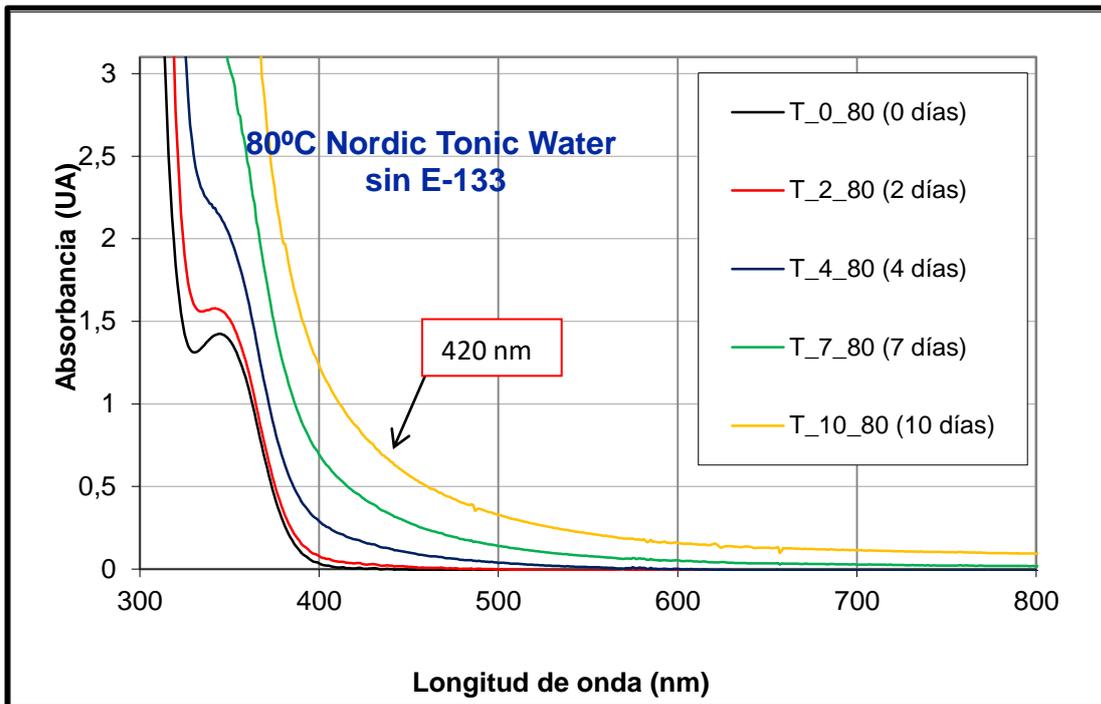




El amarilleamiento producido en el *Vino B* y *Nordic Tonic Water* queda justificado, ya que observando los datos del espectrofotómetro de estas bebidas sin el colorante E-133 en su composición, podemos comprobar que en la región de 380-435 nm (región en la cual el color absorbido es el violeta y el color transmitido y observado a simple vista es el amarillo verdoso) existen variaciones en función del tiempo de los diferentes espectros de absorción.

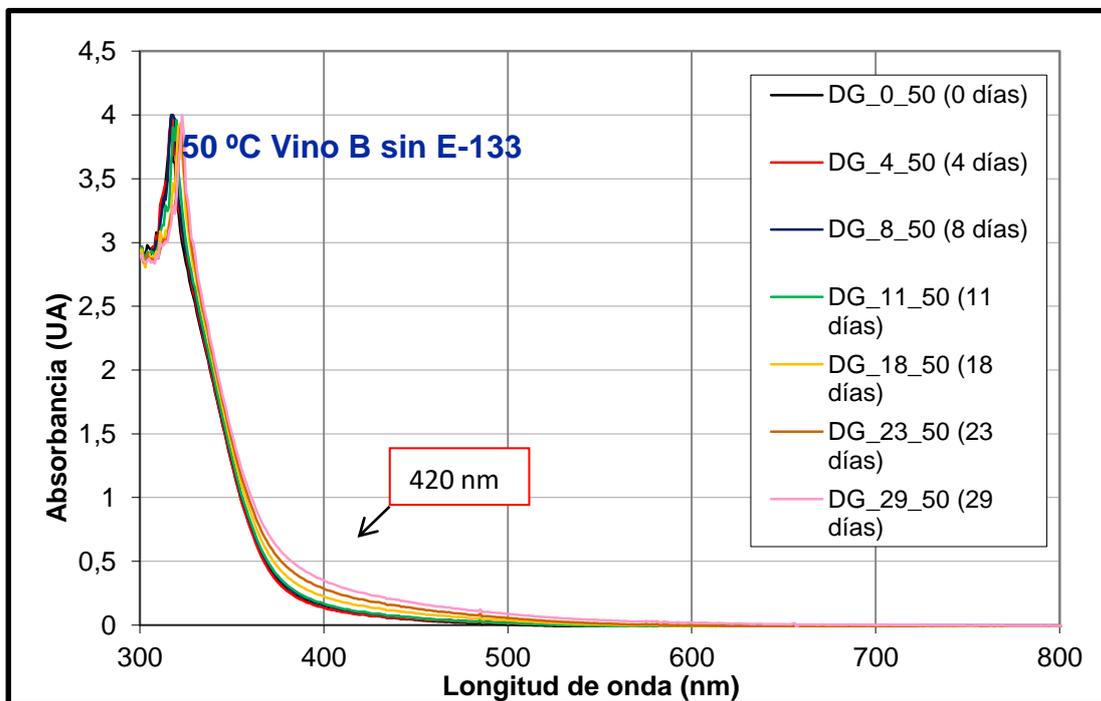
Observando los espectros de absorción se llegó a la conclusión de que ambas bebidas podían presentar un máximo de absorción entre 280 y 360 nm. (VER FIGURAS 78 y 79)

[21]



**FIGURA 78: Espectro de absorción de *Nordic Tonic Water* a 80°C**

Fuente Espectrofotómetro



**FIGURA 79: Espectro de absorción de *Vino B* sin adición de E-133 a 50°C**

Fuente Espectrofotómetro



En definitiva, los datos facilitados por este equipo nos ayudaron a demostrar la existencia de compuestos amarillos que podrían proceder de reacciones químicas de oxidación de compuestos fenólicos. Dichas reacciones son totalmente independientes de la concentración de colorante adicionado a la bebida.

Cabe mencionar que la degradación del colorante E-133 se puede correlacionar con la disminución de las absorbancias a 630 nm con el tiempo. De manera aproximada las caídas serían entre el 5-10%.

#### ***4.2.1.9. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia de las bebidas modelo.***

Al igual que se realizó con el espectrofotómetro, se realizaron diferentes análisis mediante el cromatografo. Se tomaron muestras de los vinos los días 0, 4, 8, 11, 18 y 29, en cambio de las bebidas sin alcohol se recogieron los días 0, 2, 4, 7 y 10.

Mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se intenta identificar aquellos compuestos originados en la degradación del colorante E-133, y lograr mediante este método explicar razonadamente el origen del color verde en aquellas bebidas que sufren la degradación del colorante.

##### ***4.2.1.9.1. Análisis de Soda Schweppes.***

Se han estudiado cromatogramas en dos regiones totalmente diferenciadas del espectro de absorción de dicha soda, una longitud de onda de 280 nm y otra de 630 nm. A una longitud de onda de 280 nm aparece un pico de absorción característico con un área de 1853 mAU min. Este pico de absorción aparece a los 1,18 minutos, debido a que está



presente en la bebida que no contiene el E-133 se sobreentiende que no es un compuesto originado de la degradación de dicho colorante, con lo cual se barajó la hipótesis de que pudiese ser ácido cítrico presente en la composición de la bebida.

Cabe destacar que a una longitud de onda de 630 nm, en la bebida que se adiciono *Azul Brillante FCF*, apareció únicamente el pico de absorción característico del propio colorante, ya que su tiempo de retención fue de 22 minutos. En esta región de longitud de onda no se presentaron diferentes picos de absorción debido a que tal como se demostró con el espectrofotómetro en el ensayo de estabilidad, esta bebida no sufre degradación de su colorante. (VER TABLA 5)

**Tabla 5. Análisis por HPLC de *Soda Schweppes***

Bebida	Tiempo (días)	Región de 280 nm	Región de 630 nm	% Color
		t=1,18 min	t= 21,95 min	
		Área mAU min	Área mAU min	
<i>Soda Schweppes</i> con E-133	0	1853	453,8	100
	2	969	452,3	99,7
	4	794	451,6	99,5
	7	701	451,3	99,4
	10	641	448,9	98,9

Fuente: Elaboración propia



#### 4.2.1.9.2. Análisis de *Upgrade Blue*

De la misma manera que se realizó con *Soda Schweppes*, la bebida isotónica *Upgrade Blue* se estudió a longitudes de onda de 280 y 630 nm.

A la longitud de onda de 280 nm se obtuvieron picos de absorción de tiempo de retención 1,15-2,8-3,98 y 5,9 minutos.

El mayor aumento de área en función del tiempo se observó en el pico de absorbancia surgido a los 3,98 minutos, llegando a alcanzar niveles de 6394,6 mAU.

En el rango de longitud de onda de 630 nm apareció un compuesto que podría ser procedente de la degradación del E-133, el cual tuvo un tiempo de retención de 23,09 minutos. Cabe destacar que a los 22 minutos apareció el pico de absorción característico del *Azul Brillante FCF*.

La degradación del colorante E-133 ha sido de un 18,9 % tras 10 días. (**VER TABLA 6**)

**Tabla 6. Análisis por HPLC de *Upgrade Blue***

Bebida	Tiempo (días)	Región de 280 nm				Región de 630 nm	
		t=1,15 min	t=2,80 min	t=3,98 min	t=5,90 min	t= 21,93 min	t= 23,09 min
		Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min
<i>Upgrade Blue</i>	0	161,6	0	0	0	190,2	0
	2	144	0	287,6	5	189,5	6,5
	4	117	9,6	4656	78,3	171,5	18,4
	7	123,6	13,2	6394,6	133,5	154,5	25,8
	10	0		7819		152,9	26,1

Fuente: Elaboración propia



#### 4.2.1.9.3. Análisis de *Nordic Tonic Water*

En el estudio de los cromatogramas de *Nordic Tonic Water*, se observaron los componentes presentes a 280 nm. A 280 nm se formaron diferentes compuestos los cuales se reflejaron a diferentes tiempos de retención en el cromatograma; 2,83, 4, y 6 minutos, también se produjeron degradaciones de compuestos presentes en la tónica a 1,18 minutos, como en el caso anterior de *Soda Schweppes* y *Upgrade Blue*.

Al igual que se vió con la bebida *Upgrade Blue*, esta bebida presentó un pico de absorción a los 4 minutos, el cual poseía una gran área llegando a obtener niveles de 31066 mAU. Sin embargo, no tiene relación alguna con la presencia del colorante E-133, pues no está presente. Este compuesto podría ser responsable del color amarillo que se observa en la muestra. Visualmente se observa amarilla la muestra a los 4 días y esto supone un área de 27000 mAU.

Como hemos mencionado en el estudio del cromatograma de *Soda Schweppes* y *Upgrade Blue*, la degradación presente a los 1,18 minutos en la región de longitud de onda de 280 nm podría hacer referencia al ácido cítrico presente en dicha bebida. **(VER TABLA 7)**



**Tabla 7. Análisis por HPLC de *Nordic Tonic Water***

Bebida	Tiempo (días)	Región de 280 nm				
		t=1,18 min	t=2,83 min	t=4 min	t=5,99 min	t=6,3 min
		Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min
<i>Nordic Tonic Water</i>	0	2198	0	4712	17	0
	1	1409	31	12293	53	
	2	1252	123	20047	136	
	4	1189	405	26914	338	
	7	980	1018	34615	905	370
	10	1085	723	31066	601	283

Fuente: Elaboración propia

#### 4.2.1.9.4. Análisis de *Nordic Tonic Blue*

Este tipo de tónica contiene el colorante *Azul Brillante FCF* en su interior, con lo cual las regiones de longitud de onda que se estudiaron fueron a 280 nm y a 630 nm.

En la región de 280 nm nos encontramos con los mismos picos de absorción presentes en *Nordic Tonic Water* y con valores de áreas muy similares. No obstante, como este tipo de tónica presentó degradación del colorante en el experimento de estabilidad, ya que el colorante E-133 disminuyó su concentración un 15% durante dicho experimento, se puede comprobar que en la región de los 630 nm existen compuestos originados de dicha degradación cuyos tiempos de retención son de 21,36 y 23,11 minutos.

En esta longitud de onda también se observaron las degradaciones de impurezas presentes de manera inicial en la bebida, las cuales se manifestaron a un tiempo de 22,33 minutos.

**(VER TABLA 8)**



**Tabla 8. Análisis por HPLC de *Nordic Tonic Blue***

Bebida	T(d)	Región de 280 nm					Región de 630 nm				
		t=1,18 min	t=2,83 min	t=4 min	t=5,99 min	t=6,3 min	t=21,36 min	t=22 min	% C	t=22,3 min	t=23,11 min
		Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min		Área mAU min	Área mAU min
<i>Nordic Tonic Blue</i>	0	556	0	7,9	0	0	0	392	100	13,4	10,1
	2	676	5,8	4310	17,5	0	3,2	378	96,4	12,6	12,2
	4	673	51,3	14287	77,9	28,5	4,6	367	93,6	12,2	16,3
	4	678	175,1	22808	228	142	6,9	353,5	90,2	12,2	22,8
	7	627	279,2	26383	370	222,6	8,8	343	87,5	12,5	28,4
	10		487	29757,6	593	260	9,8	331,6	84,6	11,8	29,8

Fuente: Elaboración propia

#### 4.2.1.9.5. Análisis de *Vino B*

En el caso del *Vino B* con E-133 a una longitud de onda de 280 nm no se observó pico de absorción a un tiempo de 1,18 min, esto es posible que se deba a que en su composición química no presenta ácido cítrico, también destacar, que el pico de absorción a 2,8 minutos tampoco aparece. Sin embargo, tal como sucedió con *Tonic Nordic Water* aparecieron compuestos a tiempos de 4 y 6 minutos, teniendo en cuenta que tanto *Nordic Tonic Water* como *Upgrade Blue* no presentaban inicialmente estos compuestos.

A longitudes de onda de 630 nm podemos observar que la variación de área del colorante E-133 en función del tiempo es prácticamente nula, lo que conllevó a considerar que dicho colorante no sufría degradación a 50°C. Por lo tanto el resto de compuestos azules presentes en el vino que no variaron tampoco su concentración eran impurezas presentes de manera inicial.

Estas impurezas tenían un tiempo de retención de 22,33 y 23,11 minutos. (VER TABLA 9)

**Tabla 9. Análisis por HPLC de *Vino B***

Bebida	T (d)	Región de 280 nm			Región de 630 nm				
		t=1, 18 min	t=4 min	t=5,99 min	t= 21,36 min	t= 22 min	% C	t= 22,33 min	t= 23,11 min
Vino B con E- 133		Área mA U min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min	Área mAU min		Área mAU min	Área mAU min
	0	0	144,7	11,2	0	207,7	100,0	7,1	5,7
	4	0	258,3	20,1	0	210,6	101,4	7,2	6,2
	8	0	340,2	28,2	0	207,1	99,7	7,2	6,3
	11	0	451,3	34,9	0	209,8	101,0	7,3	6,5
	18	0	613,7	43,4	0	210,2	101,2	7,4	6,9
	23	0	744,9	50,5	0	209,8	101,0	7,4	6,8
	29	0	886,5	56,2	0	209,2	100,7	7,3	6,9

Fuente: Elaboración propia

Se puede indicar, que después de analizar las diferentes bebidas, el compuesto más destacable es el que se presenta a un tiempo de retención de 4 minutos, el cual tiene una longitud de onda máxima de 270 y 300 nm, y otra máxima a 230 nm

De manera visual en la FIGURA 72 se observa un viraje a color verdoso el día 18, y en esa muestra solo presenta un área de 614, con lo que se podría concluir que hay otros compuestos probablemente polifenólicos que dan la coloración amarilla tras el almacenamiento.

Eliminar estos compuestos polifenólicos evitaría el verdeamiento en vinos con coloración azul.



### 4.3. Estabilidad de nuevos colorantes azules en bebidas comerciales

En este experimento se persiguió sustituir el *Azul Brillante FCF* por otros colorantes alimentarios azules totalmente naturales, como es el caso de *Natural Blue* y *Espirulina Blue*.

Para llevar a cabo esta tarea se estudió las tonalidades de dichos colorantes naturales en diferentes bebidas comerciales, a pH variados. En caso de que el colorante utilizado otorgase a la bebida en cuestión unas adecuadas propiedades organolépticas, se estudiaría su estabilidad a diferentes temperaturas para observar la degradación de dicho colorante y si sería viable en el mercado.

#### 4.3.1. Estabilidad *Natural Blue*

El colorante *Natural Blue* como se mencionó anteriormente en el apartado 1.2.2.2 es un conjunto de antocianinas compuestos por cadenas de carbono C6-C3-C6; y, su primer y segundo anillo de benceno se denominan anillo A y B respectivamente.

Las bebidas que se utilizaron con este tipo de colorante fueron *Aquarius* y *Nordic Tonic Water*. Como hemos explicado, el pH influye considerablemente en la tonalidad del colorante en la bebida en cuestión, es por esta razón por la cual se estudia la acción de los colorantes naturales a diferentes pH.



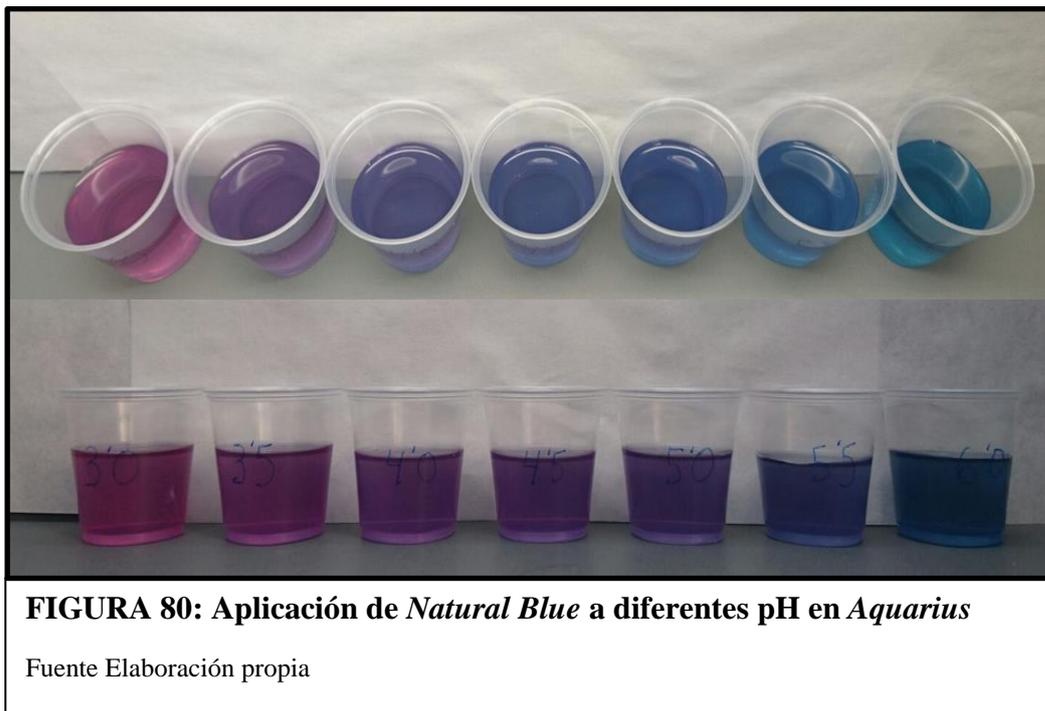
#### 4.3.1.1. Adición de *Natural Blue* a *Aquarius*.

Se estudió la tonalidad de los antocianos en *Aquarius* desde un pH inicial de 3,0 hasta alcanzar un pH final de 6,0. La variación del pH se realizó mediante la adición de disolución de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>).

Para mejorar la dilución del colorante en la bebida y distribuir homogéneamente el hidróxido de sodio se utilizaron agitadores magnéticos.

Podemos comprobar que en torno a pH de 3-4 el *Aquarius* presentó colores morados y violetas, mientras que a pH más altos dicha bebida se mostró con colores más azulados.

**(VER FIGURA 80)**



En definitiva, se concluyó que la utilización de antocianos, como colorante natural, en la bebida *Aquarius* no podía utilizarse en el mercado. La razón de ello fue que a pH



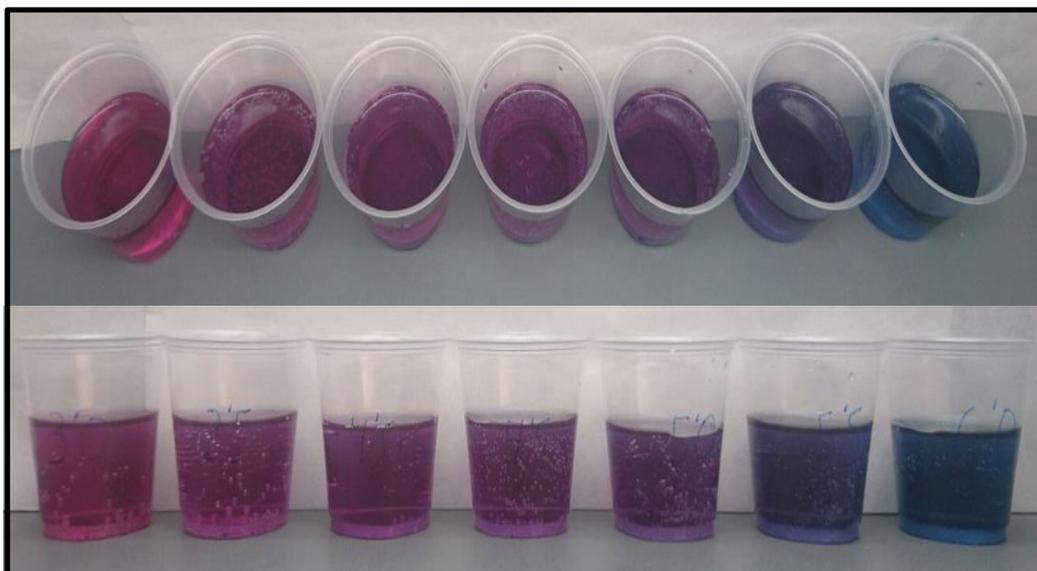
característicos de las bebidas (2,5-3,5) dicho colorante no tintaba las bebidas del color azul buscado, sino que las coloreaba de violeta o morado.

#### ***4.3.1.2. Adición de Natural Blue a Nordic Tonic Water.***

En este caso se llevó a cabo la adición de antocianos en *Nordic Tonic Water*. Tal como se realizó con *Aquarius*, se estudió la influencia de la acidez de la bebida en dicho colorante, desde un pH inicial de 3,0 hasta un pH final de 7,0.

La principal diferencia se basó en que la variación del pH para esta bebida se realizó mediante la adición de disolución de hidrogeno sodio carbonato ( $\text{HCO}_3\text{Na}$ ), debido a la composición química de dicha tónica.

En el estudio de la influencia de la acidez en la acción del colorante se llegó a la conclusión que la tónica presentó colores violetas y morados a pH algo más altos que *Aquarius*, en otras palabras, se precisa de pH más básicos para obtener una coloración azul, con lo cual el uso del colorante en *Nordic Tonic Water* resultó menos efectivo. (**VER FIGURA 81**)



**FIGURA 81: Aplicación de *Natural Blue* a diferentes pH en *Nordic Tonic Water***

Fuente Elaboración propia

Sabiendo esto, se llegó a la conclusión de que la presencia de antocianos en este tipo de tónica no resultaba rentable para el mercado.

#### **4.3.2. Estabilidad *Espirulina Blue*.**

La *Espirulina Blue* tal como citamos en el apartado 1.2.2.1 es una cianobacteria rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes, y también contiene ficocianinas en su composición.

La forma de presentación de este colorante puede ser tanto líquida como sólida. Para comprobar la diferente acción del colorante en función de su presentación se adicionó *Espirulina Blue líquida* a *Aquarius* a pH 3,5 y a *Nordic Tonic Water* a pH 2,5, y se introdujo *Espirulina Blue sólida* en *Don Luciano Gold* y en *Nordic Tonic Water*.



A diferencia del *Natural Blue* la adición de *Espirulina Blue* si provocaba un color azul en las bebidas a pH comerciales, por consiguiente se estudió su estabilidad a diferentes temperaturas, para observar la degradación de dicho colorante.

#### 4.3.2.1. Adición de *Espirulina Blue líquida a Aquarius*.

En primer lugar se modificó el pH del *Aquarius* mediante la adición de una disolución de hidróxido sódico, hasta alcanzar un pH de 3,5.

Al comprobar que la adición de la *Espirulina Blue líquida* provoca la tonalidad deseada en la bebida a un pH comercial, se comenzó con el estudio de estabilidad de dicho colorante natural. Para ello se guardaron diferentes muestras a 25, 50 y 80°C en las respectivas estufas.

El tiempo que estuvieron las muestras en las estufas fue de 1 día, debido a que se observaron precipitados al día siguiente de haberlos almacenado.

A 25°C el color logro mantenerse, mientras que a 50 y 80°C se observaron diferentes precipitados en la bebida. (VER FIGURA 82)



**FIGURA 82:** Aplicación de *Espirulina Blue líquida* a pH 3,5 en *Aquarius*

Fuente Elaboración propia

Estos precipitados presentes en el refresco demostraron la causa de que la espirulina no sea un colorante utilizado de manera habitual en la industria agroalimentaria para sus productos a pH ácidos. Solamente se podría proponer su uso para productos refrigerados.



#### 4.3.2.2. Adición de *Espirulina Blue sólida* a *Don Luciano Gold*.

La *Espirulina Blue sólida* fue utilizada en el vino *Don Luciano Gold* para comprobar la acción de dicho colorante en bebidas alcohólicas. A diferencia del resto de bebidas no se modificó el pH inicial de este vino, es decir, se estudió la acción de la *espirulina sólida* a un único pH de 3,0.

La razón de no variar el pH se debió a la turbidez que presentó el vino al adicionarle el colorante, por consiguiente no se valoró el hecho de realizar experimentos a diferentes pH, puesto que desde un punto de vista comercial un vino no puede ser turbio. (VER FIGURA 83)



**FIGURA 83:**  
**Aplicación de**  
***Espirulina Blue***  
**sólida a pH 3,0 en**  
***Don Luciano Gold***

Fuente Elaboración propia

#### 4.3.2.3. Adición de *Espirulina Blue sólida* a *Nordic Tonic Water*.

En el caso de *Nordic Tonic Water* se utilizó una disolución de hidrogeno de sodio carbonato para obtener tres muestras a pH diferentes (3,0;3,5;4,0). El color que se obtuvo en las muestras fue un azul más intenso, no existiendo diferencias apreciables a simple vista entre ambas muestras. (VER FIGURA 84)



**FIGURA 84:** Aplicación de *Espirulina Blue sólida* a pH 3,0-4,0 en Nordic Tonic Water

Fuente Elaboración propia

Sin embargo, las tónicas que contienen el *Azul Brillante FCF* en su composición química no presentan turbidez y la tonalidad de azul que poseen es algo más suave que la obtenida en el experimento con *Espirulina Blue líquida*.

Por lo tanto no se procedió al estudio de su estabilidad, puesto que la turbidez presente en las tónicas no es válida para la industria agroalimentaria.



## 5.-Conclusiones

Del estudio analítico realizado mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrofotometría se demostró la presencia del colorante E-133 en la mayoría de las bebidas comerciales estudiadas salvo una bebida que contenía el colorante E-132. Además no se detectaron otras adulteraciones del color.

Cabe mencionar que gracias a estos equipos se supo que la concentración de colorante necesario para cada tipo de bebida difería en función de la tonalidad del producto comercial. Las concentraciones determinadas están entre 1-26 ppm, las cuales se consideran muy inferiores a los valores legales de dosis diaria admisible.

Tras los experimentos de estabilidad de las bebidas comerciales se llegó a la conclusión de que todas las bebidas estudiadas no sufrieron degradación del colorante E-133 a temperaturas de 25°C, con lo cual se consideran viables para su venta en los diferentes canales de distribución. El colorante E-133 también fue estable a 50°C en los vinos al menos durante 29 días, y al menos 51 días en bebidas isotónica y tónicas. Los estudios indican que el verdeamiento de las bebidas azules va ligado a la presencia de compuestos fenólicos en su composición, que se encuentran presentes en las bebidas refrescantes con zumo de frutos cítricos, en las tónicas y en los vinos.

En el estudio de la degradación acelerada del colorante a 80°C en diferentes bebidas modelo azules con pH en torno a 2,5-3,5 y con una concentración de colorante similar, se encontró la presencia de compuestos amarillos que podrían ser originados por la oxidación de compuestos fenólicos.

A 80°C se observó una degradación en bebidas isotónicas de un 18,9% en 12 días y de un 15 % en una tónica en 12 días.



También se vio mediante el uso del HPLC la presencia de impurezas de los colorantes en las bebidas y la formación de nuevos componentes que no estaban presentes antes en la bebida y que provienen de la degradación del propio colorante o de compuestos presentes en cada bebida.

En último lugar se buscó la sustitución del colorante E-133 por colorantes naturales azules, como *Espirulina Blue* y *Natural Blue*, en bebidas azules como tónicas, bebidas isotónicas y vinos.

*Natural Blue* provocó la formación de colores no deseados (violetas y no azules) en el producto final a los pH ácidos de las bebidas, mientras que la *Espirulina Blue* originó los depósitos en el fondo del envase y aumentó la turbidez de las bebidas estudiadas. Todo ello causa que las propiedades organolépticas y la calidad del producto final se vean considerablemente disminuidas.

Así no fue posible proponer un colorante azul para sustituir al colorante E-133 en bebidas refrescantes y en vinos.



## 6.-Bibliografía

- [1] FRANCISCO C. IBAÑEZ, PALOMA TORRE, AURORA IRIGOYEN (2003) “ADITIVOS ALIMENTARIOS” en *Universidad Pública de Navarra*. [Consulta: 27 Julio de 2018]  
<[http://www.nutricion.org/publicaciones/revista\\_agosto\\_03/Funcionales/aditivos.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/aditivos.pdf)>
- [2] ENEDINA LUCAS VIÑUELA “CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS. EVALUACIÓN DE SU INGESTA” en *FAO*. [Consulta: 27 Julio de 2018]  
<[http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/pdf/aditivos.pdf](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/pdf/aditivos.pdf)>
- [3] LEÓN VILLANÚA (1986) “ADITIVOS ALIMENTARIOS” en *Fundación Española de la Nutrición*. [Consulta: 27 Julio de 2018]  
<<https://www.fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/27-Aditivos%20alimentarios.pdf>>
- [4] Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios. (Codex Stan 192 - 1995) (Rev. 2-1999).
- [5] REGLAMENTO (CE) No 1333/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.



- [6] ROSA MARÍA GARCÍA GIMENO “ADITIVOS ALIMENTARIOS” en *Universidad de Cordoba*. Artículo de investigación. [Consulta: 27 Julio de 2018]  
<[https://www.researchgate.net/profile/ROSA\\_MARIA\\_GARCIA-GIMENO/publication/242690388\\_ADITIVOS\\_ALIMENTARIOS/links/555c559508ae8f66f3aded35/ADITIVOS-ALIMENTARIOS.pdf](https://www.researchgate.net/profile/ROSA_MARIA_GARCIA-GIMENO/publication/242690388_ADITIVOS_ALIMENTARIOS/links/555c559508ae8f66f3aded35/ADITIVOS-ALIMENTARIOS.pdf)>
- [7] AFCA-Nutraceuticals Europe (2018) “The event of functional ingredients, novel foods and finished products” *Madrid*. [Consulta: 15 Agosto de 2018]  
<<http://www.afca-aditivos.org/index.asp>>
- [8] Todo para Industria de Alimentos. Guía de Proveedores. [Consulta: 15 Agosto de 2018]  
<<http://revistaalimentos.com/guia/category/colorantes>>
- [9] ROCÍO SÁNCHEZ JUAN (2013) “LA QUÍMICA DEL COLOR EN LOS ALIMENTOS”. *Química Viva*, 12 ( 3), 234-246.
- [10] MARÍA CINTA RODA SERRAT, KNUD VILLY CHRISTENSEN, RIME BAHJI EL-HOURI, XAVIER FRETTE (2018) “FAST CLEAVAGE OF PHYCOCYANOBILIN FROM PHYCOCYANIN FOR USE IN FOOD COLOURING”. *Food Colouring*, 240, 655-661.
- [11] NEDA AHMADIANI (2012) *Anthocyanin Based Blue Colorant*. Tesis Doctoral. The Ohio State University.



- [12] PubChem. Open Chemistry Data Base. [Consulta: 27 Julio de 2018]  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>
- [13] Hydro-Glow Laboratorios. *Composición y características de la Spirulina*. [Consulta: 27 Julio de 2018]  
<<https://hgl.la/Composicion-y-caracteristicas-de-la-Spirulina-3-public>>
- [14] REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N o 643/2013 DE LA COMISIÓN de 4 de julio de 2013 relativo a la autorización del azul patente V como aditivo para piensos destinados a animales no productores de alimentos y por el que se modifica el Reglamento (CE) n o 358/2005.
- [15] LANCE A. WARD “Sectores Basados en Recursos Biológicos” en *Industria de las Bebidas*, David Franson et al. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Ed. Chantal Dufrense, BA
- [16] CATALINA GONZÁLEZ ZAGAL (2013) “Panorama nacional e internacional de jugo de frutas y hortalizas” en *ODEPA Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile*.
- [17] *Industria de Bebidas* (2009) N° VII. Paraguay: Unidad Técnica de Estudios para la Industria. [Consulta: 21 Julio de 2018]  
<[http://www.mic.gov.py/mic/site/industria/deei/pdf/Perfil\\_Sect/Bebidas.pdf](http://www.mic.gov.py/mic/site/industria/deei/pdf/Perfil_Sect/Bebidas.pdf)>
- [18] *Bebidas refrescantes* (2015) en Mercasa. [Consulta: 21 Julio de 2018]



<[http://www.mercasaediciones.es/alimentacion\\_2016/pdfs/Sectores/Bebidas\\_refrescantes\\_2016.pdf](http://www.mercasaediciones.es/alimentacion_2016/pdfs/Sectores/Bebidas_refrescantes_2016.pdf)>

- [19] *Bebidas espirituosas* (2015) en Mercasa. [Consulta: 21 Julio de 2018]  
<[http://www.mercasaediciones.es/alimentacion\\_2016/pdfs/Sectores/Bebidas\\_espirituosas\\_2016.pdf](http://www.mercasaediciones.es/alimentacion_2016/pdfs/Sectores/Bebidas_espirituosas_2016.pdf)>
- [20] MARIO SÁNCHEZ URBINA (2017) “Tendencias para innovar en la industria de bebidas en 2017 y 2018” en *FuturisticLAB. Consultoría en Disruptividad Estratégica*. 12 de Mayo. [Consulta: 15 Agosto de 2018]  
<<https://www.futuristiclab.com/single-post/2017/05/12/Tendencias-para-INNOVAR-en-la-industria-de-BEBIDAS-en-2017-y-2018>>
- [21] Agilent Technologies. *Agilent 8453 Sistema de Espectroscopía UV-visible* [Consulta: 20 Agosto de 2018]  
<[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1115-95021\\_ebook.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1115-95021_ebook.pdf)>
- [22] DANIEL C. HARRIS (2006). *ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO*. Grupo Editorial Iberoamerica.
- [23] SKOOG, D.A.; Leary J.J., Holler F. James; *PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL*, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill (1998), págs. 353-367.
- [24] LEY DE BOUGUER-LAMBERT-BEER [Consulta: 20 Agosto de 2018]



<<https://www.uv.mx/personal/aherrera/files/2014/05/L.-Ley-de-Bouguer-Lambert-Beer-0.pdf>>

- [25] O'REILLY, J. E. (1975). Fluorescence experiments with quinine. *Journal of Chemical Education*, 52 pp. 610-612



## Anexo I: IX Congreso Internacional de Química de Anque



### HPLC ANALYSIS OF BLUE COLORANTS IN WINES

J.M. Obón, I. Catalá, R. García-Nicolás, J.A. Fernández-López

Dpto. Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Politécnica de Cartagena

Campus Alfonso XIII, 46, 32300 Cartagena (Spain)

✉ josemaria.obon@upct.es ☎ 968325564

#### 1.- Introduction



One of the most important attributes of wines for marketing is color. Blue color is an interesting option to develop a novel segment for potential millennial consumers, using novel tonalities alternatives to classic red or white wines. Nowadays consumers can choose a wide variety of blue wines in the supermarkets (Mehta & Bhanja, 2018).

The palette of blue natural colorants is wide including phycocyanin, genipin, jagua blue, gardenia blue, and anthocyanins. The use of natural blue colorants in foods is always in competition with synthetic food colorants as Patent Blue V (E 131), Indigotine (E 132) and Brilliant Blue FCF (E 133) (Newsome et al., 2014; Sigurdson et al., 2017).

#### 2.- Objective

Because blue wines are expected to contain colorants, this study propose a new HPLC method valid to analyze the presence of blue food colorants. This method is fast and reliable, and it was applied to detect blue colorants present in commercialized blue wines and sparkling blue wines. This work aid in the development of novel blue wines and its quality control.



#### 3.- Materials and methods

##### Materials

• Patent Blue V (E 131), Indigotine (E 132) and Brilliant Blue FCF (E 133) were from ROHA Europe S.L.U (Valencia, Spain).

• Commercial wines used were bought in a local supermarket:

- Wine A
- Wine B
- Wine C
- Wine D
- Wine E
- Wine F



##### HPLC method

- HPLC series 1200 of Agilent Technologies (USA)
- Column C18 Zorbax SB 3.5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm)
- Column temperature: 40°C. Injection: 5  $\mu\text{L}$
- Flow 1 mL/min. Detection 620 nm.
- Phase A: Ammonium acetate 35 mM pH 7.0 Acetonitrile 1% (v/v)
- Phase B: Ammonium acetate 35 mM pH 7.0 Acetonitrile 50% (v/v)
- Elution gradient:

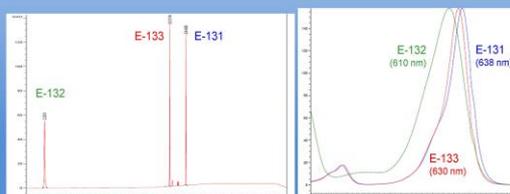
Time (min)	0	1	17	26	36	37	40
% B	10	10	30	100	100	10	10



HPLC

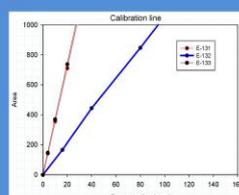
#### 3.- Results

Figures show a chromatogram of the standard dyes studied, their correspondent normalized spectra, and the linearity range.



Chromatogram of dyes

Spectrum of dyes



Calibration line of dyes

Dye	Retention time (min)	Line Equation
E-131	24,5	$y = 35,56 x$
E-132	2,8	$y = 10,59 x$
E-133	22,0	$y = 36,91 x$

Chromatograms of wines and dye standards were analysed and finally compared. Chromatograms of wines showed only one peak. Retention times of the peaks and spectra were used to evidence the presence of dyes and to confirm its composition. The concentration has been calculated with the calibration line for each dye.

The results for each wine were:

Wine	Dye in wine	Retention time (min)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Area (mAU min)	Concentration (ppm)
A	E-133	22,0	630	258,4	6,7
B	E-133	22,0	630	72,4	1,9
C	E-133	22,0	630	437,5	11,8
D	E-133	22,0	630	517,5	14,0
E	E-131	24,5	638	472,2	13,3
F	E-133	22,0	630	104,9	2,8

#### 4.- Concluding remarks

It is evidenced that this method is an efficient and very simple and quick method to identify the dyes present in commercial wines. Method could also be applied to other foods. In all analyzed samples, it was only found presence of approved synthetic food colorants as Patent Blue V and Brilliant Blue FCF.

#### 5.- References

- Mehta, R.; Bhanja, N. (2018) Consumer preferences for wine attributes in an emerging market. *Int. J. Retail Distrib. Manag.*, 46, 34-48.
- Newsome, A.G.; Culver, C.A.; van Breemen, R.B. (2014). Nature's Palette: The Search for Natural Blue Colorants. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 6498-6511.
- Sigurdson, G.T.; Tang, P.P.; Giusti, M.M. (2017) Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual review of Food Science and Technology*, 8, 261-280.



## Anexo II: Índice de tablas

- TABLA 1 → Listado de aditivos autorizados
- TABLA 2 → Gradiente de fase móvil B
- TABLA 3 → Análisis de los colorantes
- TABLA 4 → Análisis por HPLC de las bebidas
- TABLA 5 → Análisis por HPLC de *Soda Schweppes*
- TABLA 6 → Análisis por HPLC de *Upgrade Blue*
- TABLA 7 → Análisis por HPLC de *Nordic Tonic Water*
- TABLA 8 → Análisis por HPLC de *Nordic Tonic Blue*
- TABLA 9 → Análisis por HPLC de *Vino B*



## Anexo III: Índice de tablas

- FIGURA 1→ Azul patente V (E-133)
- FIGURA 2→ Indigotina o carmín de índigo (E-132)
- FIGURA 3→ Azul Brillante FCF (E-133)
- FIGURA 4→ Espirulina Blue
- FIGURA 5→ Composición E-131
- FIGURA 6→ Composición E-132
- FIGURA 7→ Composición E-133
- FIGURA 8→ Composición antocianos
- FIGURA 9→ Comercio mundial de bebidas
- FIGURA 10→ Consumo mundial de bebidas
- FIGURA 11→ Consumo anual de bebidas sin alcohol
- FIGURA 12→ Principales empresas de bebidas a nivel mundial
- FIGURA 13→ Diferentes vinos comerciales con colorante azul
- FIGURA 14→ Diferentes bebidas sin alcohol comerciales con E-133
- FIGURA 15→ pH-metro
- FIGURA 16→ Espectrofotómetro UV-Vis
- FIGURA 17→ HPLC
- FIGURA 18→ Estufas
- FIGURA 19→ Balanza electrónica
- FIGURA 20→ Agitadores magnéticos
- FIGURA 21→ Disoluciones preparadas pH-metro
- FIGURA 22→ Sistema óptico de un espectrofotómetro



- FIGURA 23 → Espectro de absorción de E-131 (azul), E-132 (verde) y E-133 (rojo)
- FIGURA 24 → Cromatograma del colorante E-131
- FIGURA 25 → Cromatograma del colorante E-132
- FIGURA 26 → Cromatograma del colorante E-133
- FIGURA 27 → Recta de calibrado de los colorantes
- FIGURA 28 → Cromatograma de *Vino A*
- FIGURA 29 → Cromatograma de *Vino B*
- FIGURA 30 → Cromatograma de *Vino C*
- FIGURA 31 → Cromatograma de *Vino D*
- FIGURA 32 → Cromatograma de *Vino E*
- FIGURA 33 → Cromatograma de *Powerade Blue*
- FIGURA 34 → Cromatograma de *Upgrade Blue*
- FIGURA 35 → Cromatograma de *Sunny Delight Blue*
- FIGURA 36 → Cromatograma de *Fusión Frutas*
- FIGURA 37 → Cromatograma de *Nordic Tonic Blue*
- FIGURA 38 → Cromatograma de *Original Premium Tonic*
- FIGURA 39 → Estabilidad de vinos a 25°C
- FIGURA 40 → Estabilidad de vinos a 50°C
- FIGURA 41 → Espectro de absorción del *Vino A* a 25°C
- FIGURA 42 → Espectro de absorción del *Vino A* a 50°C
- FIGURA 43 → Espectro de absorción del *Vino B* a 25°C
- FIGURA 44 → Espectro de absorción del *Vino B* a 50°C
- FIGURA 45 → Espectro de absorción del *Vino C* a 25°C
- FIGURA 46 → Espectro de absorción del *Vino C* a 50°C



- FIGURA 47→ Espectro de absorción del *Vino D* a 25°C
- FIGURA 48→ Espectro de absorción del *Vino D* a 50°C
- FIGURA 49→ Espectro de absorción del *Vino E* a 25°C
- FIGURA 50→ Espectro de absorción del *Vino E* a 50°C
- FIGURA 51→ Estabilidad de bebidas isotónicas a 25 y 50°C
- FIGURA 52→ Espectro de absorción de *Isotónica 1* a 50°C
- FIGURA 53→ Espectro de absorción de *Isotónica 1* a 80°C
- FIGURA 54→ Espectro de absorción de *Isotónica 2* a 50°C
- FIGURA 55→ Espectro de absorción de *Isotónica 2* a 80°C
- FIGURA 56→ Estabilidad de bebidas con zumo de frutas a 25 y 50°C
- FIGURA 57→ Espectro de absorción de *Bebida con zumo de frutas 1* a 50°C
- FIGURA 58→ Espectro de absorción de *Bebida con zumo de frutas 1* a 80°C
- FIGURA 59→ Espectro de absorción de *Bebida con zumo de frutas 2* a 50°C
- FIGURA 60→ Espectro de absorción de *Bebida con zumo de frutas 2* a 80°C
- FIGURA 61→ Estabilidad de tónicas a 25 y 50°C
- FIGURA 62→ Espectro de absorción de *Tónica 1* a 50°C
- FIGURA 63→ Espectro de absorción de *Tónica 1* a 80°C
- FIGURA 64→ Espectro de absorción de *Tónica 2* a 50°C
- FIGURA 65→ Espectro de absorción de *Tónica 2* a 80°C
- FIGURA 66→ Estabilidad de bebidas sin alcohol a 80°C
- FIGURA 67→ Estabilidad de *Soda Schweppes* a 80°C
- FIGURA 68→ Estabilidad de *Upgrade Blue* a 80°C
- FIGURA 69→ Estabilidad de *Nordic Tonic Water* a 80°C
- FIGURA 70→ Estabilidad de *Nordic Tonic Blue* a 80°C
- FIGURA 71→ Estabilidad de *Vino B* sin E-133 a 50°C



- FIGURA 72→ Estabilidad de *Vino B* a 50°C
- FIGURA 73→ Fluorescencia a *Nordic Tonic Water*
- FIGURA 74→ Espectro de absorción de *Soda Schweppes* con adición de E-133 a 80°C
- FIGURA 75→ Espectro de absorción de *Upgrade Blue* con adición de E-133 a 80°C
- FIGURA 76→ Espectro de absorción de *Nordic Tonic Blue* con adición de E-133 a 80°C
- FIGURA 77→ Espectro de absorción de *Vino B* con adición de E-133 a 50°C
- FIGURA 78→ Espectro de absorción de *Nordic Tonic Water* a 80°C
- FIGURA 79→ Espectro de absorción de *Vino B* sin adición de E-133 a 50°C
- FIGURA 80→ Aplicación de *Natural Blue* a diferentes pH en *Aquarius*
- FIGURA 81→ Aplicación de *Natural Blue* a diferentes pH en *Nordic Tonic Water*
- FIGURA 82→ Aplicación de *Espirulina Blue líquida* a pH 3,5 en *Aquarius*
- FIGURA 83→ Aplicación de *Espirulina Blue sólida* a pH 3,0 en *Don Luciano Gold*
- FIGURA 84→ Aplicación de *Espirulina Blue sólida* a pH 3,0-4,0 en *Nordic Tonic Water*