

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR UPLC-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE ERITROSINA (E127) EN BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO.

AUTOR:

ANGIE ARLETTE GUALE COELLO

Guayaquil - Ecuador

2026

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar la conformidad de un método UPLC-DAD para la cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas gaseosas y rehidratantes frente a los requisitos de validación establecidos en la norma ISO/IEC 17025:2017. Para ello, se desarrolló un procedimiento cromatográfico orientado a la identificación y cuantificación del analito, empleando curvas de calibración en el rango de 0,05–2,50 µg/mL y un esquema experimental aplicado y controlado. La validación se efectuó siguiendo lineamientos internacionales (Eurachem e ISO/IEC 17025) y consideró selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, robustez e incertidumbre de medida. El método mostró un comportamiento lineal consistente (R^2 entre 0,9970 y 0,9995), ausencia de interferencias relevantes en el tiempo de retención del analito y un desempeño adecuado de precisión y exactitud para su uso rutinario. Los LOD/LOQ fueron 0,0193/0,0642 µg/mL en rehidratante y 0,0117/0,0391 µg/mL en gaseosa, con incertidumbre expandida relativa de 7,97% ($k=2$). Finalmente, se aplicó el método a 12 bebidas del mercado ecuatoriano, obteniéndose resultados no detectados (<LOD), lo que confirma su aptitud para control analítico.

Palabras claves: Eritrosina (E127), UPLC-DAD, validación analítica, ISO/IEC 17025, bebidas.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the conformity of a UPLC–DAD method for the quantification of erythrosine (E127) in carbonated and rehydration beverages with the validation requirements established in ISO/IEC 17025:2017. For this purpose, a chromatographic procedure was developed for the identification and quantification of the analyte, using calibration curves in the range of 0.05–2.50 µg/mL and a controlled experimental design. Method validation was performed following international guidelines (Eurachem and ISO/IEC 17025:2017) and included selectivity, linearity, limits of detection and quantification, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, robustness, and measurement uncertainty. The method showed consistent linear behavior (R^2 between 0.9970 and 0.9995), absence of relevant interferences at the analyte retention time, and adequate precision and accuracy for routine use. The LOD/LOQ values were 0.0193/0.0642 µg/mL in rehydration beverages and 0.0117/0.0391 µg/mL in carbonated beverages, with a relative expanded uncertainty of 7.97% ($k = 2$). Finally, the method was applied to the analysis of 12 beverages from the Ecuadorian market, yielding non-detected results (<LOD), which confirms its suitability for analytical control.

Keywords: Erythrosine (E127), UPLC–DAD, analytical validation, ISO/IEC 17025, beverages.

DEDICATORIA

"A mi familia, con amor."

AGRADECIMIENTO

Expreso mi profundo agradecimiento a mi tutor, MSc. Michael Rendón, por su dedicación y orientación. A la institución, ESPOL, por brindarme las herramientas para crecer académicamente. A la Q.F. Esther Alcívar y al Ing. Joel Barba por su apoyo durante este proceso. Asimismo, extendo mi gratitud a quienes, de alguna manera, se sientan representados en este trabajo.

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo Angie Arlette Guale Coello acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. El o los estudiantes deberán procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 15 marzo del 2026

Angie Arlette Guale Coello

EVALUADORES

Michael Guillermo Rendón
Morán, MS.c.
TUTOR

Cesar Augusto Araque Molina,
Ph.D.
EVALUADOR

Joel Vielma Puente, Ph.D.
PRESIDENTE

ABREVIATURAS O SIGLAS

ARCSA: Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (Ecuador)

DAD: Detector de arreglo de diodos

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (EE. UU.)

ICH: Consejo Internacional para la Armonización

ISO: Organización Internacional de Normalización

IEC: Comisión Electrotécnica Internacional

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

RSD: Desviación estándar relativa

%RSD: Porcentaje de desviación estándar relativa

%RSDi: Porcentaje de desviación estándar relativa (precisión intermedia)

R²: Coeficiente de determinación

RT: Tiempo de retención

mAU: Unidades de absorbancia mili

μL: Microlitro

mL: Mililitro

μg/mL: Microgramo por mililitro

k: Factor de cobertura

U%: Incertidumbre expandida relativa

E127: Eritrosina

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
DECLARACIÓN EXPRESA	VI
EVALUADORES	VII
ABREVIATURAS O SIGLAS	VIII
TABLA DE CONTENIDO.....	IX
LISTADO DE FIGURAS	XII
LISTADO DE TABLAS.....	XIV
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2. Descripción del problema	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4. Hipótesis.....	6
1.5. Alcance.....	6
CAPÍTULO 2.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Los colorantes sintéticos en la industria alimentaria	7
2.1.1. Clasificación de los colorantes alimentarios.....	7
2.1.1.1 Por su origen.....	7
2.1.1.2 Clasificación regulatoria según la FDA.....	8
2.1.1.3 Por su solubilidad	8
2.1.2. Función tecnológica de colorantes	9
2.1.3. Riesgos toxicológicos asociados.....	9
2.2 La eritrosina (E127): características y regulación	10
2.2.1 Estructura química y propiedades fisicoquímicas.....	10
2.2.2 Propiedades fisicoquímicas	11

2.2.3 Usos industriales y aplicaciones	11
2.3 Métodos analíticos para la determinación de colorantes	12
2.3.1 Métodos espectrofotométricos	12
2.3.2. Métodos cromatográficos.....	12
2.4 Parámetros de validación analítica	13
2.4.1 Concepto y propósito de la validación.....	13
2.4.2. Parámetros fundamentales de validación	13
2.4.2.1. Selectividad/Especificidad	13
2.4.2.2. Linealidad	14
2.4.2.3. Rango de trabajo.....	14
2.4.2.4. Límite de detección (LOD).....	14
2.4.2.5. Límite de cuantificación (LOQ).....	14
2.4.2.6. Exactitud	14
2.4.2.7. Precisión	15
2.4.2.8. Repetibilidad	15
2.4.2.9. Precisión intermedia.....	15
2.4.2.10. Robustez	15
2.4.2.11. Incertidumbre de medida	15
2.5. Sostenibilidad, control de calidad y vigilancia sanitaria.....	16
2.5.1 Importancia del control de aditivos alimentarios.....	16
2.5.2 Contexto Nacional.....	17
2.5.3 Toxicología y estudios relevantes.....	17
CAPÍTULO 3.....	18
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1 Enfoque de la investigación	18
3.1.1 Tipo de investigación	18
3.1.2 Diseño de investigación	18
3.2 Metodología.....	19
3.2.1 Variables	19
3.2.2. Diseño experimental	19
3.3. Recolección de datos	20
3.3.1 Métodos y técnicas	20
3.3.1.1 Procedimiento para la cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas	20
3.4. Recursos	30

3.4.1 Reactivos	30
3.4.2 Equipos	30
3.4.2 Materiales	30
CAPÍTULO 4.....	33
4. RESULTADOS	33
4.1 Procedimiento UPLC-DAD para eritrosina en bebidas: diseño cromatográfico e identificación.....	33
4.2 Desempeño y validación analítica del método UPLC-DAD: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, LOD/LOQ e incertidumbre.....	34
4.2.1 Evaluación preliminar del desempeño cromatográfico del método	34
4.2.2 Resultados de validación	36
4.2.2.1 Selectividad.....	36
4.2.2.2 Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ).....	39
4.2.2.3 Linealidad.....	40
4.2.2.4 Precisión	40
4.2.2.5 Exactitud	44
4.2.2.6 Robustez.....	46
4.2.2.7 Incertidumbre	47
4.3 Aplicación en bebidas comerciales y verificación regulatoria de E127 en el mercado ecuatoriano	50
CAPÍTULO 5.....	52
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1 Conclusiones	52
5.2 Recomendaciones	53
6. REFERENCIAS.....	54
7. APÉNDICES Y ANEXOS.....	59
APÉNDICE A: PROCEDIMIENTO DE OBJETIVO 1	59
APÉNDICE B: LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	68
APÉNDICE C: LINEALIDAD.....	69
APÉNDICE D: PRECISIÓN REPETIBILIDAD	81
APÉNDICE E: PRECISIÓN INTERMEDIA	86
APÉNDICE F: EXACTITUD.....	89
APÉNDICE G: ROBUSTEZ.....	92
ANEXO H: CERTIFICADO DE ESTÁNDARES	93

LISTADO DE FIGURAS

Figura 3.1 Diagrama de flujo de proceso.....	32
Figura 4.1 Cromatograma del estándar de eritrosina.....	36
Figura 4.2 Esquema metodológico del desarrollo del método.....	36
Figura 4.3 Cromatograma de gaseosa fortificada a 0.096 µg/mL.....	38
Figura 4.4 Cromatograma de bebida hidratante fortificada a 0.496 µg/mL.....	38
Figura 4.5 Diagrama de causa–efecto (Ishikawa)	48
Fig A.1 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	59
Fig A.2 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	60
Fig A.3 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	61
Fig A.4 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	62
Fig A.5 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	63
Fig A.6 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	64
Fig A.7 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	65
Fig A.8 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	66
Fig A.9 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina.....	67
Fig C.1 Datos experimentales de la curva de calibración día 1.....	69
Fig C.2 Promedios por nivel de calibración (Curva Día 1).....	69
Fig C.3 Curva de calibración día 1.....	70
Fig C.4 Estadísticas de regresión día 1.....	70
Fig C.5 Análisis de varianza día 1.....	70
Fig C.6 Coeficientes e intervalo de confianza regresión día 1.....	71
Fig C.7 Gráfico de residuales día 1.....	71
Fig C.8 Análisis de residuales día 1.....	72
Fig C.9 Datos experimentales de la curva de calibración día 2.....	73
Fig C.10 Promedios por nivel de calibración (Curva Día 2).....	73
Fig C.11 Curva de calibración día 2.....	74
Fig C.12 Estadísticas de regresión día 2.....	74
Fig C.13 Análisis de varianza día 2.....	74
Fig C.14 Coeficientes e intervalo de confianza regresión día 2.....	75
Fig C.15 Gráfico de residuales día 2.....	75
Fig C.16 Análisis de residuales día 2.....	76

Fig C.17 Datos experimentales de la curva de calibración día 3.....	77
Fig C.18 Promedios por nivel de calibración (Curva Día 3).....	77
Fig C.19 Curva de calibración día 3.....	78
Fig C.20 Estadísticas de regresión día 3.....	78
Fig C.21 Análisis de varianza día 3.....	78
Fig C.22 Coeficientes e intervalo de confianza regresión día 3.....	79
Fig C.23 Gráfico de residuales día 3.....	79
Fig C.24 Análisis de residuales día 3.....	80
Fig D.1 Repetibilidad día 1.....	81
Fig D.2 Repetibilidad día 2.....	82
Fig D.3 Repetibilidad día 3.....	83
Fig D.4 Nivel bajo gaseosa.....	84
Fig D.5 Nivel medio gaseosa.....	84
Fig D.6 Nivel alto gaseosa.....	84
Fig D.7 Nivel bajo hidratante.....	85
Fig D.8 Nivel medio hidratante.....	85
Fig D.9 Nivel alto hidratante.....	85
Fig E.1 Precisión intermedia gaseosa nivel bajo.....	86
Fig E.2 Precisión intermedia gaseosa medio bajo.....	86
Fig E.3 Precisión intermedia gaseosa nivel alto.....	87
Fig E.4 Precisión intermedia hidratante nivel bajo.....	87
Fig E.5 Precisión intermedia hidratante nivel medio.....	88
Fig E.6 Precisión intermedia hidratante nivel alto.....	88
Fig F.1 Exactitud día 1.....	89
Fig F.2 Exactitud día 2.....	90
Fig F.3 Exactitud día 3.....	91
Fig G.1 Resultados robustez bebidas hidratantes.....	92
Fig G.2 Resultados robustez bebidas gaseosas.....	92
Fig H.1 Estándar primario.....	93
Fig H.2 Estándar secundario.....	94

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1 Plan experimental de estudio	20
Tabla 3.2 Condiciones cromatográficas	22
Tabla 3.3 Síntesis del diseño experimental.....	23
Tabla 3. 4 Síntesis del diseño experimental.....	24
Tabla 3. 5 Plan de validación	27
Tabla 3.6 Plan de robustez	28
Tabla 3.7 Distribución de experimentos por parámetros.....	28
Tabla 3.8 Objetivos de validación	29
Tabla 3.9 Lista de reactivos	30
Tabla 3.10 Lista de equipos	30
Tabla 3.11 Lista de materiales	30
Tabla 4.1 Resultados de selectividad	37
Tabla 4.2 LOD y LOQ de eritrosina (E127) por UPLC-DAD.....	39
Tabla 4.3 Parámetros de regresión para la evaluación de la linealidad	40
Tabla 4.4 Repetibilidad por día y nivel de concentración	41
Tabla 4.5 Repetibilidad por matriz y nivel	41
Tabla 4.6 Parámetros y grados de libertad precisión intermedia.	42
Tabla 4.7 Corrida (día/analista) Matriz bebida gaseosa.....	42
Tabla 4.8 ANOVA de un factor bebida gaseosa	43
Tabla 4.9 Corrida (día/analista) Matriz bebida hidratante	43
Tabla 4.10 ANOVA de un factor bebida hidratante.....	44
Tabla 4.11 %REC por día (bajo, medio y alto).....	45
Tabla 4.12 %REC por nivel y matriz (días 1–3).	45
Tabla 4.13 Robustez bebidas hidratantes.....	46
Tabla 4.14 Robustez bebidas gaseosas	46
Tabla 4.15 Componentes de la incertidumbre	48
Tabla 4.16 Resumen de incertidumbre (k = 2).....	49
Tabla 4.18 Resultados obtenidos.....	49
Tabla 4.17 Muestras de bebidas comerciales.....	51

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la presentación visual se ha vuelto un factor clave en alimentos y bebidas industrializados, ya que influye en la elección del consumidor y en la construcción de una imagen reconocible del producto. En la industria alimentaria, los colorantes forman parte del grupo de aditivos utilizados para conservar o ajustar el aspecto visual de alimentos y bebidas cuando ocurren cambios de color por procesos tecnológicos o por variaciones propias de la materia prima; dado que la apariencia influye en la elección del consumidor, su empleo se relaciona con criterios de aceptabilidad del producto (U.S. Food and Drug Administration, 2023). Dentro de estos aditivos, los colorantes sintéticos se han extendido por ofrecer coloración uniforme, buena estabilidad y una implementación práctica y costo-eficiente en comparación con fuentes naturales, razón por la cual se encuentran en múltiples tipos de alimentos y bebidas (Dey & Nagababu, 2022).

En este contexto, la eritrosina (E127), también conocida como Rojo No. 3, ha sido evaluada por organismos regulatorios debido a consideraciones de seguridad, lo que ha generado criterios de aceptación y restricción diferentes entre países (EFSA, 2011). Ante ello, los laboratorios requieren métodos analíticos confiables para verificar su presencia y concentración en matrices de alto consumo como las bebidas; en este sentido, la cromatografía líquida (HPLC/UPLC) con detección por arreglo de diodos (DAD) permite separar e identificar el analito y apoyar su confirmación (Ma et al., 2025) Sin embargo, en el contexto local no siempre se dispone de procedimientos validados que sirvan como base para su implementación rutinaria en laboratorios nacionales.

La validación de métodos analíticos es un paso clave para demostrar que un procedimiento es apto para su propósito y ofrece un desempeño aceptable en condiciones definidas. En términos operativos, este proceso permite establecer el comportamiento del método dentro de un rango de trabajo determinado y sustentar, con evidencia verificable, la confiabilidad de los resultados obtenidos. En laboratorios que

operan bajo sistemas de gestión alineados con la norma ISO/IEC 17025, esta evidencia se respalda mediante la evaluación documentada de parámetros como selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, y robustez, siguiendo lineamientos técnicos reconocidos como los propuestos por Eurachem.

Finalmente, para contextualizar y delimitar el estudio, en los apartados siguientes se presentan los antecedentes del tema, el planteamiento del problema, los objetivos general y específicos, la hipótesis de trabajo y el alcance de la investigación. Posteriormente, se describe la metodología adoptada para el desarrollo y validación del método por UPLC-DAD para la determinación de eritrosina (E127) en bebidas, bajo criterios de ISO/IEC 17025 y Eurachem, estableciendo la base para el análisis y discusión de resultados.

1.1 Antecedentes

Según Sánchez (2013), desde tiempos antiguos el ser humano ha utilizado colorantes en los alimentos con el fin de mejorar su apariencia, haciéndolos más atractivos y aceptables para el consumo. Estos aditivos pueden clasificarse en colorantes naturales, extraídos de fuentes vegetales o animales, y colorantes sintéticos, obtenidos por síntesis química. Entre estos últimos, los colorantes sintéticos han ganado protagonismo por su intensidad, estabilidad y bajo costo, siendo comúnmente empleados en una amplia variedad de alimentos procesados. La eritrosina, identificada como E127, es uno de los colorantes sintéticos más utilizados, y se aplica en productos como golosinas, cerezas confitadas, bebidas y postres, cumpliendo principalmente la función de restaurar o reforzar el color perdido durante el procesamiento y almacenamiento (pp. 235–245).

Según Ibáñez, Torre y Irigoyen (2003), La aparición de los colorantes sintéticos en la industria alimentaria tuvo un auge destacado durante el siglo XIX, periodo en el que se consolidó el desarrollo de compuestos orgánicos de síntesis aplicados al coloreado de alimentos. Esta transición respondió, en gran medida, a la inestabilidad de los colorantes naturales, los cuales mostraban limitaciones frente a los cambios que sufrían los alimentos durante su procesamiento y conservación. En sus primeras aplicaciones, algunos de estos aditivos artificiales se emplearon de forma incorrecta o incluso fraudulenta, utilizando sustancias derivadas de metales pesados como el cobre, el plomo o el arsénico, las cuales representaban riesgos para la salud. Con el tiempo, la industria alimentaria ha tendido hacia una mayor precaución, priorizando, cuando es viable, el uso

de pigmentos de origen natural, aunque los colorantes sintéticos siguen desempeñando un papel relevante por su intensidad, estabilidad y bajo costo (pp. 1–10).

La eritrosina (E127), uno de los colorantes sintéticos más empleados en productos como bebidas, golosinas y postres, ha sido objeto de regulación en distintas partes del mundo. Su aceptación varía considerablemente entre países, generando un escenario normativo heterogéneo. Mientras algunas autoridades permiten su uso bajo límites máximos establecidos, otras lo restringen o prohíben debido a preocupaciones toxicológicas. Esta disparidad normativa se debe, en parte, a los distintos enfoques en la evaluación del riesgo y a la ausencia de un consenso internacional. Como resultado, colorantes autorizados en la Unión Europea pueden estar vetados en lugares como Estados Unidos, Japón o Noruega, lo que ha impulsado múltiples estudios sobre su seguridad y uso responsable (Ibáñez et al., 2003).

De acuerdo con U.S. Food and Drug Administration (2017), Diversos países han adoptado medidas para restringir o prohibir el uso del colorante sintético Rojo 3 (eritrosina) en productos alimenticios, motivados por estudios que evidencian riesgos para la salud. En enero de 2025, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) anunció la revocación de la autorización para su uso en alimentos y medicamentos ingeridos, basándose en la Cláusula Delaney, que prohíbe aditivos que causen cáncer en humanos o animales. Esta decisión se fundamentó en investigaciones que demostraron la aparición de tumores tiroideos en ratas macho expuestas a altas dosis del colorante. Previamente, en 1990, la FDA ya había prohibido su uso en cosméticos y medicamentos tópicos por razones similares (U.S. Food and Drug Administration, 2025).

En la literatura científica se han documentado múltiples investigaciones que emplean técnicas cromatográficas modernas, como la cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD), para el análisis de colorantes sintéticos en matrices alimentarias complejas. En este contexto, (Palianskikh et al., 2022). desarrollaron y validaron un método cromatográfico capaz de cuantificar dieciséis colorantes artificiales en diferentes matrices, demostrando una alta linealidad, precisión y exactitud. Este tipo de estudios representa un referente técnico relevante que, al ser adaptado y evaluado en distintas matrices, continúa ampliando el conocimiento científico

sobre el comportamiento analítico de los colorantes sintéticos, contribuyendo así al fortalecimiento de los sistemas de control en la industria alimentaria.

1.2. Descripción del problema

Frente a las crecientes preocupaciones sobre la seguridad de ciertos colorantes sintéticos, en enero de 2025 la FDA revocó la autorización del Rojo 3 (eritrosina) en alimentos y medicamentos vía oral, al considerar su vinculación con tumores tiroideos en estudios con animales (Sánchez, 2013). Sin embargo, a pesar de esta decisión, la ausencia de un control eficaz puede derivar en una exposición prolongada de los consumidores a este aditivo, sin que se tenga certeza sobre el cumplimiento de los niveles permitidos.

Para ejercer un control real sobre este tipo de aditivos, es necesario contar con métodos analíticos validados que permitan su detección y cuantificación en los productos donde se utiliza. La falta de procedimientos específicos para matrices como las bebidas impide verificar si se cumplen los límites establecidos y dificulta la intervención de las autoridades sanitarias frente a posibles riesgos.

Con base en la revisión realizada, la mayoría de los métodos disponibles para la determinación de eritrosina han sido desarrollados para matrices distintas, como cápsulas, mezclas vitamínicas o alimentos sólidos, y no pueden aplicarse directamente al análisis de bebidas debido a las diferencias en la composición, las posibles interferencias y el comportamiento cromatográfico. Estas particularidades de la matriz líquida exigen que cada ensayo sea abordado de forma específica, lo cual limita la aplicabilidad general de los procedimientos existentes.

Cabe señalar que actualmente no se cuenta con un método oficial estandarizado a nivel nacional para la cuantificación de eritrosina en bebidas, lo que representa una limitación técnica en los procesos de control y vigilancia alimentaria, especialmente en lo relacionado con la trazabilidad y calidad metrológica de los resultados.

Esta falta de procedimientos validados y adaptados a bebidas representa un obstáculo especialmente crítico para muchos laboratorios del país que, debido a restricciones presupuestarias o limitaciones en su infraestructura técnica, no disponen de los recursos necesarios para desarrollar estudios propios de validación sin un punto de partida. En este contexto, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA,

2025) ha iniciado acciones orientadas al fortalecimiento del control y la vigilancia preventiva, así como al desarrollo de estrategias regulatorias que contemplan un plazo hasta enero de 2028 para la reformulación de alimentos y medicamentos que contengan el colorante Rojo No. 3.

Esta situación reduce el incentivo para que las industrias realicen estos análisis de manera sistemática. En consecuencia, los laboratorios no cuentan con una base metodológica local que oriente sus procesos analíticos ni con un respaldo regulatorio que justifique la inversión en este tipo de ensayos. No obstante, este proyecto se plantea de manera anticipada a un posible escenario en el que el control de colorantes como la eritrosina llegue a ser exigido oficialmente, permitiendo así contar con una herramienta validada que facilite su implementación técnica y normativa en el futuro.

En atención a lo expuesto, y considerando la necesidad de contar con un procedimiento analítico validado y aplicable a bebidas, el presente estudio se orienta a responder la siguiente pregunta de investigación:

¿El método de análisis por UPLC-DAD para la determinación de eritrosina (E127) en bebidas gaseosas y rehidratantes cumple con los requisitos de validación establecidos en la norma ISO/IEC 17025:2017?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Validar un método analítico basado en UPLC-DAD para la cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas de consumo humano, conforme a los lineamientos de estándares internacionales basados en la norma ISO/IEC 17025.

1.3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un procedimiento cromatográfico mediante UPLC para la identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en matrices de bebidas.
- Evaluar el desempeño del método desarrollado mediante la determinación de parámetros de validación analítica: selectividad, linealidad, precisión (repetibilidad

y reproducibilidad), exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) e incertidumbre de medición.

- Aplicar el método validado a muestras comerciales de bebidas disponibles en el mercado ecuatoriano para la determinación cuantitativa de eritrosina (E127), y comparar los resultados con los límites establecidos en la normativa vigente.

1.4. Hipótesis

Bajo las condiciones cromatográficas establecidas, el método UPLC-DAD desarrollado para la determinación de eritrosina (E127) en bebidas gaseosas e hidratantes es adecuado para el propósito analítico propuesto, ya que cumple con los requisitos de validación establecidos en la norma ISO/IEC 17025:2017

1.5. Alcance

El presente estudio se enfoca en la validación de un método analítico instrumental por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UPLC) para la detección y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas comercializadas en Ecuador. Para evaluar el desempeño del método en distintas condiciones de matriz, se trabajará con dos tipos de bebidas que representan niveles bajos, medios y altos de concentración del colorante: bebidas gaseosas y bebidas hidratantes. El método será validado exclusivamente para bebidas y no será aplicable a otras matrices alimenticias no consideradas en este estudio. Asimismo, el alcance del proyecto no incluye estudios toxicológicos ni evaluaciones de estabilidad del colorante. El tiempo de ejecución del estudio será de cuatro meses, correspondientes al período 2025–2026.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Los colorantes sintéticos en la industria alimentaria

En la actualidad, el color constituye un elemento determinante en los alimentos procesados, pues influye notablemente en la manera en que el consumidor percibe su calidad y aceptabilidad. Por este motivo, los colorantes se emplean como aditivos destinados a uniformar y realzar la apariencia visual de los productos. En los últimos años, el interés por los pigmentos naturales ha aumentado de forma considerable, impulsado por una mayor conciencia sobre los posibles efectos negativos asociados a los colorantes sintéticos y por la preferencia de los consumidores hacia opciones más saludables. Estas tendencias coinciden con las nuevas demandas del mercado, que promueven la transparencia en la información al consumidor y la sustitución progresiva de ingredientes artificiales (Luzardo et al., 2021).

Los colorantes naturales han cobrado relevancia no solo por su función estética, sino también por el papel que pueden desempeñar en el desarrollo de alimentos más sostenibles y funcionales, lo que ha motivado una creciente atención desde la investigación y la innovación tecnológica en este campo (Luzardo-Ocampo et al., 2021).

2.1.1. Clasificación de los colorantes alimentarios

2.1.1.1 Por su origen

Colorantes naturales

De acuerdo con Pino et al. (2020), Los pigmentos naturales empleados como colorantes alimentarios provienen de una amplia variedad de materias primas vegetales, entre las que se incluyen frutas, hortalizas, flores y subproductos agroindustriales. Su incorporación en alimentos responde a la tendencia creciente hacia productos más saludables, libres de aditivos sintéticos y con beneficios funcionales. Estos compuestos, además de su función colorante, pueden ejercer actividad antioxidante, lo que los convierte en ingredientes de valor agregado dentro del desarrollo de alimentos funcionales (pp. 9–10).

Colorantes artificiales

Según Dey y Nagababu (2022), los colorantes alimentarios cumplen una función esencial en la aceptabilidad sensorial del alimento, ya que el color influye de manera determinante en la percepción y preferencia del consumidor (pp. 2–3). Los colorantes sintéticos no poseen un origen natural, ya que se obtienen mediante síntesis química o transformaciones físico-químicas que les otorgan propiedades diferenciadas respecto a los pigmentos naturales (Sánchez, 2013, pp. 235–238).

La producción sintética confiere ventajas tecnológicas importantes, ya que permite controlar propiedades como estabilidad, solubilidad, intensidad cromática y costo de producción. Históricamente, muchos colorantes se originaron a partir de la brea de hulla, lo que favoreció su estandarización industrial. Estas características han permitido su amplio uso en alimentos y bebidas (Sánchez, 2013, pp. 236–244).

2.1.1.2 Clasificación regulatoria según la FDA

La U.S. Food and Drug Administration (FDA) clasifica los colorantes alimentarios en dos categorías principales: aquellos que requieren certificación y aquellos exentos de certificación. Los primeros son producidos por síntesis química y deben someterse a revisión por lote para verificar el cumplimiento de estándares de pureza y calidad. Los segundos, generalmente de origen natural, no requieren certificación por lote, pero deben cumplir criterios de seguridad y condiciones de uso establecidos por la autoridad reguladora (FDA, 2023).

2.1.1.3 Por su solubilidad

La solubilidad constituye un criterio clave al momento de elegir y formular colorantes alimentarios, porque determina cómo se dispersan, se estabilizan y se comportan en distintas matrices. Según (Novais et al., 2022) el carácter hidrofílico o lipofílico de la molécula define si el colorante se disuelve mejor en medios acuosos o grasos, condicionando así su desempeño tecnológico. Los pigmentos solubles en agua, como las antocianinas y las betalainas, se adaptan con mayor facilidad a productos líquidos, mientras que otros más apolares, entre ellos carotenoides y clorofilas, necesitan sistemas ricos en lípidos o estrategias como la encapsulación para lograr una mayor estabilidad. En conjunto, la solubilidad influye tanto en la intensidad y homogeneidad del color como en la respuesta frente a factores de degradación, entre ellos el pH, la luz, la

temperatura y los procesos oxidativos, aspectos que han sido objeto de amplio análisis en la literatura reciente sobre colorantes naturales.

2.1.2. Función tecnológica de colorantes

Desde la perspectiva tecnológica, los colorantes se incorporan a los alimentos para manejar y sostener su apariencia visual, especialmente cuando el procesamiento o el almacenamiento afectan negativamente el color original del producto. En términos prácticos, esto implica reforzar o recuperar tonalidades que se debilitan, disimular diferencias de color entre lotes y mantener un aspecto homogéneo que el consumidor reconozca y asocie con cierta calidad. De esta manera, los colorantes no solo “pintan” el alimento, sino que contribuyen a preservar su identidad visual y a mantenerlo atractivo y aceptable a lo largo de su vida útil (Dey & Nagababu, 2022).

2.1.3. Riesgos toxicológicos asociados

Diversos estudios aportan evidencia de que los colorantes sintéticos pueden generar efectos adversos en determinadas poblaciones, especialmente en niños. Miller et al. (2022) revisaron investigaciones clínicas y toxicológicas en grupos infantiles de entre 3 y 16 años y observaron que, tras la ingesta de colorantes como rojo 40, amarillo 5 o amarillo 6, se presentaron alteraciones relacionadas con la actividad, la atención, la impulsividad y otros cambios conductuales.

Aunque la magnitud de los efectos varía entre estudios, el patrón es consistente: un subgrupo de niños muestra sensibilidad particular a estos aditivos, manifestando respuestas neuroconductuales que no suelen observarse en adultos. La relevancia de estos hallazgos radica en que se repiten de manera constante en la literatura reciente, lo que sugiere que la exposición continua a colorantes sintéticos podría tener implicaciones toxicológicas significativas, especialmente en etapas tempranas del desarrollo. (Miller et al., 2022).

Otro estudio que también menciona las consecuencias de la ingesta de colorantes sintéticos es el de Patel (2025). En este trabajo se revisan estudios realizados en ratas y otros animales a los que se les administraron dosis altas de colorantes como rojo 40, tartrazina, amarillo 6 y azul brillante. En estos ensayos se observaron tumores en distintos órganos y señales de daño en el ADN de las células (pp. 16-17).

Además, plantea que estos colorantes podrían actuar a través de mecanismos como el aumento del estrés oxidativo y posibles alteraciones hormonales, lo que a largo plazo podría favorecer el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Por ello, el autor sugiere limitar el consumo de colorantes sintéticos y promover el uso de colorantes naturales, aun cuando presenten desventajas como menor estabilidad, mayor costo o cambios en la textura y apariencia de los alimentos (Patel, 2025).

2.2 La eritrosina (E127): características y regulación

2.2.1 Estructura química y propiedades fisicoquímicas

La eritrosina, es un colorante sintético de tipo xanténico utilizado como aditivo en alimentos, principalmente para aportar tonalidades rosadas o rojizas de alta intensidad. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) la clasifica dentro de los colorantes de la familia de los xantenos evaluados para su uso en productos alimenticios, considerando su estructura química y los posibles efectos derivados de su consumo. En este grupo de colorantes, la presencia de un sistema conjugado de dobles enlaces favorece la absorción de luz en la región visible, lo que explica la intensidad y estabilidad del color que proporcionan (EFSA, 2011).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) describe a la eritrosina como la sal disódica de un derivado tetraiodado de la fluoresceína, con el nombre químico disodium 2-(2,4,5,7-tetraiodo-6-oxido-3-oxoxanthen-9-yl) benzoate monohydrate. Esta definición indica que la molécula posee un núcleo xanténico sustituido con cuatro átomos de yodo y que se encuentra en forma iónica, lo que favorece su solubilidad en agua y su incorporación en matrices alimentarias de carácter acuoso. Además, la forma monohidratada es importante para establecer con precisión su peso molecular y sus especificaciones de pureza (JECFA, 1993)

La base de datos PubChem, del National Center for Biotechnology Information (NCBI), reporta para la eritrosina sódica la fórmula molecular $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ y una masa molecular aproximada de 879,9 g/mol, destacándose la presencia de cuatro átomos de yodo como rasgo característico de su estructura. Esta combinación de un núcleo aromático extendido, grupos iónicos y átomos de yodo contribuye a su buena solubilidad en agua y a su capacidad para absorber luz visible, propiedades que se relacionan

directamente con su comportamiento fisicoquímico y su utilidad como colorante en sistemas alimentarios (NCBI, n.d.).

2.2.2 Propiedades fisicoquímicas

La eritrosina sódica se presenta como un polvo o gránulos de color rojo intenso, sin olor apreciable, que se disuelven con facilidad en agua y también en etanol, lo que facilita su incorporación en jarabes y otros sistemas hidroalcohólicos (JECFA, 1993). En las preparaciones reguladas el sólido incluye, además del colorante, agua de hidratación y pequeñas proporciones de cloruro y sulfato de sodio como componentes incoloros, de modo que el producto mantiene buena fluidez, se dispersa rápidamente y conserva una estabilidad adecuada durante el almacenamiento (Apostol & Gavrilesco, 2013)

Desde el punto de vista fisicoquímico, la elevada halogenación del núcleo xanténico con cuatro átomos de yodo se traduce en una masa molecular alta y en un comportamiento óptico muy marcado, con coeficientes de absorción molar elevados en la región visible y fosforescencia asociada al estado triplete, características típicas de los colorantes xanténicos yodados (Apostol & Gavrilesco, 2013). Al mismo tiempo, su carácter iónico y la combinación de un cromóforo aromático hidrofóbico con grupos cargados explican que el colorante sea muy soluble en medios acuosos y, a la vez, capaz de interactuar con superficies menos polares, lo que resulta relevante tanto para su desempeño como aditivo en alimentos como para su movilidad y persistencia en el ambiente (JECFA, 1993).

2.2.3 Usos industriales y aplicaciones

La eritrosina (E127) se emplea como aditivo colorante en diversos productos alimenticios, con especial presencia en formulaciones líquidas como bebidas saborizadas, jarabes y cócteles sin alcohol. Su estructura química le permite disolverse fácilmente en agua y conservar su color bajo condiciones de procesamiento exigentes, lo que la hace funcionalmente útil en matrices donde otros pigmentos pierden estabilidad. En este contexto, su uso no solo responde a fines estéticos, sino también a la necesidad de mantener una apariencia uniforme y atractiva a lo largo de la vida útil del producto (Dey & Nagababu, 2022). Esta situación ha generado un mayor interés por su monitoreo en productos alimenticios, en particular en aquellos que se comercializan en grandes volúmenes y de consumo frecuente, como las bebidas.

2.3 Métodos analíticos para la determinación de colorantes

2.3.1 Métodos espectrofotométricos

la espectrofotometría UV-Visible se considera una alternativa útil para la determinación de colorantes porque permite evaluar su comportamiento de absorción en función de la longitud de onda y las condiciones del medio. En el caso de la eritrosina (E127), el análisis espectrofotométrico evidencia que su respuesta está fuertemente influenciada por los equilibrios ácido–base en solución acuosa; (Snigur et al., 2022) determinaron experimentalmente constantes de ionización (pKa) mediante UV/Vis y describieron cómo la variación del pH puede modificar la intensidad y la posición de las bandas de absorción, lo cual justifica el control del pH y de las condiciones de medición para asegurar resultados repetibles durante la calibración y el análisis de muestras (Snigur et al., 2022)

2.3.2. Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se consideran una herramienta clave para la determinación de colorantes, sobre todo cuando la muestra es compleja y se necesita una medición más específica. Su ventaja principal es que permiten separar el analito de otros componentes de la matriz antes de cuantificarlo, disminuyendo así la influencia de interferencias y mejorando la confiabilidad del resultado (Ntrallou et al., 2020). En la práctica, la cromatografía líquida permite resolver mezclas de colorantes y obtener señales individuales para cada compuesto, lo que facilita tanto su cuantificación como la verificación de su presencia dentro de un esquema de control de calidad (Han et al., 2021). Adicionalmente, cuando se emplea detección UV-Visible con arreglo de diodos (DAD/PDA), es posible registrar el espectro asociado a cada pico cromatográfico, lo que aporta un criterio adicional para apoyar la identificación y evaluar la pureza espectral del analito durante el análisis. En casos donde la confirmación requiere mayor especificidad instrumental, la cromatografía puede acoplarse a espectrometría de masas, lo cual fortalece la identificación en el análisis de colorantes (Tsai et al., 2015).

2.4 Parámetros de validación analítica

2.4.1 Concepto y propósito de la validación

La validación representa una fase esencial en el desarrollo de métodos analíticos, ya que permite verificar que el procedimiento cumple adecuadamente con su finalidad. A través de este proceso, el laboratorio asegura que los resultados generados son coherentes, precisos y técnicamente confiables. De acuerdo con la norma ISO/IEC 17025:2017, la validación incluye la revisión sistemática de parámetros como la especificidad, la exactitud, la precisión, la linealidad, los límites de detección y cuantificación, así como la estimación de la incertidumbre asociada a la medición (International Organization for Standardization, 2017)

La guía EURACHEM establece orientaciones prácticas que permiten planificar, ejecutar y evaluar la validación de métodos en laboratorios de ensayo. Este documento detalla cómo estructurar los experimentos, analizar los resultados y definir criterios de aceptación. Junto con la guía ICH Q2(R1), proporciona un marco técnico reconocido a nivel internacional que respalda la implementación de métodos analíticos robustos y adecuados para diferentes tipos de muestras (Magnusson & Örnemark, 2014), (International Council for Harmonisation (ICH), 2005).

2.4.2. Parámetros fundamentales de validación

2.4.2.1. Selectividad/Especificidad

La selectividad, llamada también especificidad según el enfoque, se entiende como la capacidad del método para reconocer y medir el analito aunque la muestra contenga otros compuestos. Esto implica que la respuesta analítica asociada al analito se mantenga clara y confiable, sin alterarse por efectos de la matriz, impurezas u otros componentes como posibles productos de degradación. En la práctica, un método selectivo se demuestra cuando no aparecen interferencias relevantes en la señal del analito y el procedimiento conserva su desempeño incluso en presencia de sustancias que podrían afectar la medición (Eurachem, 2014; International Council for Harmonisation [ICH],2023).

2.4.2.2. Linealidad

La linealidad indica si, dentro del intervalo de concentración elegido, el método responde de forma coherente: cuando se prepara una serie de estándares con concentraciones crecientes, la señal cromatográfica (área o altura del pico) debe aumentar en la misma dirección y con un patrón proporcional. Esta relación se modela mediante una regresión lineal en la curva de calibración y se revisa su calidad con criterios estadísticos para confirmar que el rango seleccionado es adecuado para cuantificar (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.3. Rango de trabajo

El rango de trabajo corresponde al conjunto de concentraciones en el que el método puede aplicarse con confianza, porque dentro de esos límites produce resultados válidos y útiles según los criterios definidos en la validación. En ese intervalo, el desempeño del método se mantiene aceptable (por ejemplo, en linealidad y consistencia de resultados) sin sobrepasar los límites de aceptación establecidos (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.4. Límite de detección (LOD)

El LOD puede entenderse como el umbral mínimo a partir del cual el método deja de “confundir” la señal del analito con el ruido o el fondo del sistema. Es decir, por encima de ese punto ya es razonable afirmar que el analito está presente, aunque todavía no sea apropiado reportar una concentración con exactitud (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.5. Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación (LOQ) es el punto a partir del cual el método ya no solo “detecta” el analito, sino que permite reportarlo con números confiables, porque la medición mantiene precisión y exactitud dentro de los criterios de aceptación. Por debajo de ese nivel, la señal puede existir, pero la variabilidad suele ser demasiado alta para asegurar una cuantificación adecuada (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.6. Exactitud

La exactitud refleja qué tan próximos están los resultados del método a un valor de referencia, por lo que evidencia si el procedimiento mide con bajo sesgo y dentro de los límites de aceptación establecidos (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.7. Precisión

La precisión se entiende como la estabilidad de los resultados cuando el mismo procedimiento se repite siguiendo condiciones definidas. En la práctica, si analizas una misma muestra varias veces y los valores obtenidos quedan muy parecidos entre sí, se considera que el método es preciso; en cambio, si los resultados se “dispersan” demasiado, la precisión es baja. Por eso, este parámetro se evalúa observando la variabilidad entre mediciones repetidas, ya que una menor variación refleja un mejor desempeño del método para el uso previsto (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.8. Repetibilidad

La repetibilidad es una forma específica de evaluar la precisión, pero en su escenario “más controlado”. Se analiza qué tan parecidos son los resultados cuando el ensayo se repite sin cambiar prácticamente nada, si en esas condiciones los valores se mantienen cercanos, se concluye que el método tiene buena repetibilidad; si se observa mucha dispersión, el desempeño del método en condiciones idénticas no es consistente (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.9. Precisión intermedia

La precisión intermedia evalúa la consistencia de los resultados cuando el método se aplica en el mismo laboratorio, pero incorporando variaciones esperables en la operación rutinaria. Estas variaciones pueden incluir cambios en el día de análisis, el analista o el equipo utilizado (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.10. Robustez

La robustez indica si el método conserva un desempeño aceptable cuando se introducen pequeños cambios intencionales en condiciones o parámetros del procedimiento. En validación, se verifica aplicando variaciones controladas (por ejemplo, ajustes menores en condiciones operativas) y evaluando si el método continúa cumpliendo los criterios de desempeño definidos para su uso rutinario (Eurachem, 2014; ICH, 2023).

2.4.2.11. Incertidumbre de medida

La incertidumbre de medida expresa el margen de dispersión razonable que acompaña a un resultado analítico; es decir, no se limita al valor reportado, sino que comunica qué

tan amplio puede ser el intervalo de valores compatibles con la medición (Eurachem/CITAC, 2012).

2.5. Sostenibilidad, control de calidad y vigilancia sanitaria

2.5.1 Importancia del control de aditivos alimentarios

El control de los aditivos alimentarios es clave porque define en qué productos pueden usarse y hasta qué nivel, de modo que la exposición del consumidor se mantenga dentro de márgenes aceptables. Esto se aprecia en la eritrosina (E127): el Reglamento (CE) n.º 1333/2008 no la autoriza de forma general, sino que la limita a usos puntuales y, por ejemplo, fija un máximo de 200 mg/kg cuando se emplea en cerezas de cóctel o confitadas (Reglamento (CE) n.º 1333/2008, 2008). Desde el punto de vista toxicológico, la EFSA recoge como referencia una IDA de 0–0,1 mg/kg de peso corporal/día, valor que sirve para interpretar el riesgo por ingesta y sustentar decisiones de control sobre este colorante (EFSA, 2011).

En Estados Unidos, el uso de colorantes en alimentos se gestiona bajo un marco regulatorio en el que la FDA define qué sustancias pueden emplearse y en qué condiciones. Esto significa que su utilización no se asume como automática, sino que depende de autorizaciones y requisitos diseñados para resguardar la seguridad del consumidor (FDA, 2023).

Bajo ese enfoque, el 15 de enero de 2025 la FDA comunicó que revocará la autorización de uso de Red No. 3 en alimentos y medicamentos de ingesta. La agencia explica que la decisión se adopta por el marco legal aplicable y se apoya en evidencia toxicológica considerada en el proceso regulatorio, lo que refuerza el carácter restrictivo con el que se evalúan ciertos aditivos cuando existen preocupaciones relevantes para la salud (FDA, 2025).

Este tipo de decisiones se entiende mejor al considerar la Cláusula Delaney, la cual establece un criterio legal estricto para los aditivos: si un compuesto ha mostrado inducir cáncer en humanos o animales bajo evidencia pertinente, se lo considera no seguro para usos regulados. En consecuencia, el control de algunos colorantes no responde únicamente a consideraciones técnicas, sino también a un mandato normativo que orienta cuándo corresponde limitar o retirar autorizaciones (FDA, 2017; FDA, 2025).

2.5.2 Contexto Nacional

En Ecuador, Arcsa informó que, tras la alerta emitida por la FDA sobre los posibles riesgos asociados al colorante FD&C Rojo No. 3 (E-127 o eritrosina), inició un proceso inmediato de evaluación de riesgo para precautelar la seguridad de los productos que lo contengan en el mercado nacional. En el mismo comunicado, la institución reportó que el uso declarado de este aditivo corresponde al 0,9% de los productos que contienen colorantes y que se identificó su presencia en aproximadamente 83 medicamentos (dentro de más de 60 mil registrados) y en cerca de 198 alimentos (de más de 55 mil certificados a nivel nacional), (ARCSA, 2025).

Asimismo, Arcsa señaló que ha desarrollado mesas de trabajo con representantes de las industrias de alimentos y medicamentos para que, como medida preventiva, se analicen y adopten alternativas seguras y científicamente avaladas. De manera complementaria, recomendó a la ciudadanía revisar las listas de ingredientes declaradas en las etiquetas para reconocer si el producto contiene “Rojo No. 3”, “E-127” o “eritrosina” (ARCSA, 2025).

2.5.3 Toxicología y estudios relevantes

En raíces de *Allium cepa*, Singh y Chadha reportaron que la eritrosina (E127) puede provocar cambios importantes en las células. Después de 96 horas, observaron una disminución del índice mitótico del 57,81% incluso a 0,1 mg/mL, lo que sugiere que la división celular se reduce. También informaron un aumento del malondialdehído (hasta 5,47 veces) y una disminución de enzimas relacionadas con la protección celular. Además, el ensayo cometa indicó mayor daño en el ADN conforme aumentó la concentración, y el análisis *in silico* mostró una interacción marcada con el ADN (Singh & Chadha, 2024).

En un modelo celular humano (HepG2), se ha reportado que la eritrosina B puede inducir efectos genotóxicos y mutagénicos bajo condiciones experimentales (Chequer et al., 2012). De forma complementaria, en un modelo animal orientado a promoción tumoral, se describió que la eritrosina (Red 3) incrementó la aparición de tumores tiroideos en ratas bajo un diseño específico del estudio (Hiasa et al., 1988).

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

La investigación se clasifica como aplicada y experimental, ya que busca desarrollar un método analítico útil para determinar eritrosina (E127) en bebidas. (Hernández & Mendoza, 2018), la investigación aplicada se orienta a resolver necesidades específicas mediante el uso del conocimiento científico, mientras que la experimental supone trabajar bajo condiciones controladas en las que se modifican variables para observar sus efectos. En este estudio, esa dinámica se evidencia en la preparación de estándares y en el ajuste de parámetros cromatográficos para evaluar la respuesta del analito mediante UPLC-DAD.

Al tratarse de un estudio experimental, se manipulan de forma directa las condiciones del sistema cromatográfico con el fin de analizar cómo estos cambios influyen en la señal obtenida. Este enfoque es esencial en la validación de métodos, ya que permite verificar si el procedimiento mantiene un desempeño consistente bajo diferentes situaciones. Para ello, se siguen los criterios establecidos por la guía EURACHEM (Magnusson & Örnemark, 2014) y los requisitos definidos por la norma ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization [ISO] & International Electrotechnical Commission [IEC], 2017).

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño adoptado en este estudio es experimental, ya que las pruebas se realizaron manipulando deliberadamente las condiciones del sistema cromatográfico para observar cómo estas variaciones influían en la respuesta del analito. Trabajar bajo un entorno controlado permitió ajustar parámetros como el flujo, la composición de la fase móvil, la temperatura de la columna y las concentraciones estándar, con el fin de evaluar el desempeño del método de forma ordenada y controlada. Este diseño hizo posible analizar parámetros clave para la validación, entre ellos la selectividad, los límites de

detección y cuantificación, la linealidad, la precisión y la robustez, asegurando que el método responda de manera consistente frente a diferentes condiciones de análisis.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

- **Variable independiente**

Niveles de concentración de eritrosina (E127) en soluciones patrón y/o muestras fortificadas (para curva y validación).

- **Variable dependiente**

Respuesta del sistema UPLC-DAD (área y/o altura del pico cromatográfico de eritrosina), a partir de la cual se calcula la concentración del analito en las muestras.

- **Variables controladas**

Condiciones del método mantenidas constantes durante el análisis por UPLC-DAD, incluyendo el volumen de inyección (μL), el flujo (mL/min), la composición de la fase móvil, la temperatura de la columna ($^{\circ}\text{C}$), el tiempo de agitación manual (min), el tiempo de sonicación (min) y la temperatura del autosampler ($^{\circ}\text{C}$).

3.2.2. Diseño experimental

El diseño experimental se organizó en una serie de etapas que permitieron desarrollar y evaluar el método de manera ordenada. Cada fase cumplió una función específica dentro del proceso, desde la preparación y acondicionamiento de las muestras hasta la validación del método. Esta organización por etapas permitió asegurar la trazabilidad del trabajo, mantener condiciones controladas durante el análisis y garantizar que los resultados obtenidos sean consistentes con los objetivos del estudio.

Adicionalmente, la secuencia planteada facilitó la identificación de los parámetros críticos del método, así como la verificación progresiva de su desempeño analítico en función de los criterios de aceptación establecidos. De este modo, se integraron tanto los aspectos operativos del sistema cromatográfico como la preparación de las muestras y el tratamiento de datos, asegurando una evaluación integral del método.

Tabla 3.1 Plan experimental de estudio

ETAPA DE ESTUDIO	DESCRIPCIÓN RESUMIDA
Acondicionamiento de muestras	Selección, desgasificación (cuando corresponde) y filtración de las bebidas antes del análisis.
Ajuste del método UPLC-DAD	Optimización del sistema cromatográfico: fase móvil, flujo, temperatura, longitud de onda y parámetros de inyección.
Validación del método	Evaluación de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, LOD, LOQ y robustez, conforme a guías EURACHEM e ISO/IEC 17025.
Procesamiento de datos	Análisis y verificación del cumplimiento de criterios de aceptación establecidos para cada parámetro calculado.
Documentación	Registro completo de procedimientos, ajustes, resultados, conclusiones y recomendaciones.

3.3. Recolección de datos

3.3.1 Métodos y técnicas

3.3.1.1 Procedimiento para la cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas

La información empleada para definir el procedimiento de análisis se tomó como referencia del estudio desarrollado por Bagyalakshmi et al. (2008), quienes describen un método cromatográfico para la determinación de eritrosina utilizando HPLC acoplado a un detector PDA. Este trabajo proporcionó una base técnica inicial para comprender el comportamiento del colorante y orientó la selección de parámetros que luego fueron adaptados al sistema UPLC-DAD disponible en el laboratorio.

a. Soluciones de trabajo en matriz

Las bebidas seleccionadas para el estudio corresponden a dos tipos de matrices ampliamente comercializadas: bebidas hidratantes y gaseosas. Debido a que no existen

productos en el mercado ecuatoriano que contengan eritrosina (E127) de manera declarada, las matrices fueron fortificadas en laboratorio para simular la presencia del colorante en distintos niveles de concentración. Para la fortificación se partió de una solución madre de eritrosina de 2000 µg/mL, a partir de la cual se prepararon las soluciones de trabajo necesarias mediante diluciones sucesivas, registrando los volúmenes empleados y los factores de dilución correspondientes.

Previo a su acondicionamiento, cada bebida será desgasificada manualmente mediante agitación suave durante 1 minuto y luego colocada en un baño ultrasónico durante 15 minutos, lo que permite eliminar el gas disuelto y obtener una matriz más estable para el análisis cromatográfico. Una vez desgasificada, se tomará un volumen representativo de la bebida y se añadirá el volumen correspondiente de la solución estándar de eritrosina para obtener las concentraciones definidas para los ensayos. La mezcla resultante se homogenizará y posteriormente se filtrará con un filtro de jeringa de nylon de 0,45 µm para remover partículas y obtener una solución limpia apta para la inyección en UPLC-DAD. Las muestras filtradas se transferirán a viales ámbar y se conservarán en condiciones adecuadas hasta su análisis.

b. Soluciones estándar para la curva de calibración

Para la preparación de los estándares, se asignó la concentración real al estándar secundario de eritrosina utilizando el estándar primario, con el fin de contar con un valor fiable para las diluciones posteriores. Una vez establecida su concentración, se preparó una solución madre de 1000 µg/ml en agua ultrapura, a partir de la cual se obtuvieron los patrones de calibración mediante diluciones sucesivas para cubrir el rango de 0.05 a 2.50 µg/ml. Todas las soluciones se homogenizaron y se conservaron en viales ámbar protegidos de la luz hasta su análisis por UPLC-DAD.

c. Condiciones cromatográficas

Durante el desarrollo del método se hicieron varias pruebas iniciales para encontrar las condiciones cromatográficas que permitieran observar la eritrosina de manera clara y sin interferencias. Estas pruebas incluyeron cambios en la fase móvil, el flujo y la longitud de onda, tomando como referencia algunos métodos publicados y lo que se pudo verificar directamente en el equipo durante las primeras inyecciones considerando que se trabajó con matrices complejas como bebidas gaseosas e hidratantes. Una vez definidos los

ajustes más estables incluyendo fase móvil, flujo, temperatura, longitud de onda y volumen de inyección se fijaron las condiciones finales empleadas en todo el proceso de validación, las cuales se detallan en la Tabla a continuación:

Tabla 3.2 Condiciones cromatográficas

PARÁMETRO	CONDICIÓN SELECCIONADA
Columna	Columna UPLC BEH, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm
Fase móvil (isocrática)	Acetato de amonio 10 mM:Metanol : Acetonitrilo (50:25:25 v/v/v), filtrada y desgasificada
Flujo	0.40 ml/min
Temperatura de columna	30°C
Temperatura de autosampler	20°C
Detector	DAD/PDA
Longitud de onda principal	529 nm (200-600 nm para verificación de pureza)
Volumen de inyección	2.0 ul
Modo de elución	Isocrático

d. Validación del método

Con las condiciones cromatográficas ya definidas, se procedió a validar el método para confirmar que su desempeño fuera adecuado para la determinación de eritrosina (E127) en las bebidas analizadas. La validación se desarrolló conforme a los criterios recomendados por la guía Eurachem y los requisitos de la norma ISO/IEC 17025, evaluando parámetros fundamentales como selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión y robustez. Para ello se utilizaron soluciones estándar dentro del rango de concentración establecido para la curva de calibración, así como muestras fortificadas que permitieron comprobar el comportamiento del analito en la matriz.

A continuación, una síntesis del diseño experimental empleado en la validación del método, incluyendo por parámetro el ensayo realizado y sus condiciones (matriz, niveles, réplicas y criterios de aceptación). Este resumen permitió ordenar y verificar el cumplimiento de los requisitos establecidos para el desempeño del método.

Tabla 3.3 Síntesis del diseño experimental

	EVALUACIÓN	ENSAYO
Selectividad / Especificidad	Se evaluó la selectividad del método UPLC-DAD para eritrosina (E127) en dos matrices: bebida tipo gaseosa y bebida hidratante . Se analizaron blanco del diluyente, matriz sin fortificar y matrices fortificadas al LOQ (0.096 µg/mL) y al nivel de trabajo (0.496 µg/mL). La adquisición se realizó con detector PDA a 529 nm, verificándose ausencia de interferencias en el TR del analito . La resolución cromatográfica (Rs) se calculará únicamente si la matriz presenta un pico adyacente cercano al analito; en caso de no existir picos próximos, la selectividad se evaluará únicamente mediante la ausencia de interferencias en el tiempo de retención del estándar.	Por matriz: 1 blanco del diluyente (agua Milli-Q) + 1 matriz sin fortificar + 1 matriz fortificada a nivel bajo + 1 matriz fortificada a nivel medio + 1 estándar de eritrosina Orden de inyección por matriz Blanco del diluyente (agua Milli-Q) (1 inyección) Matriz sin fortificar(1inyección) Matriz fortificada – nivel bajo (cercano al LOQ) (1inyección) Matriz fortificada – nivel medio (nivel de trabajo) (1inyección) Estándar de eritrosina (1 inyección).
LOD	Se estimó el LOD mediante réplicas en matriz a nivel bajo . A partir de las concentraciones obtenidas con la curva de calibración, se calculó la desviación estándar (s_0) en ese nivel y, con base en esta variabilidad, se obtuvo el valor estimado del LOD para cada matriz.	Se analizaron 10 réplicas de bebida gaseosa y 10 réplicas de bebida hidratante, fortificadas a 0.096 µg/mL y cuantificación con la curva 0.05–2.50 µg/mL.
LOQ	Se estimó el LOQ mediante réplicas en matriz a nivel bajo . A partir de las concentraciones calculadas con la curva de calibración, se obtuvo la desviación estándar (s_0) en ese nivel y, con base en esta variabilidad, se determinó el valor estimado del LOQ para cada matriz.	Se analizaron 10 réplicas de bebida gaseosa y 10 réplicas de bebida hidratante, fortificadas a 0.096 µg/mL y cuantificación con la curva 0.05–2.50 µg/mL.
Linealidad	Se evaluó la linealidad del método mediante curvas de calibración de 6 niveles en el rango 0.05–2.50 µg/ml preparado en diluyente. Los datos se ajustaron por regresión lineal al modelo $y = Sx + b$ y se evaluaron R^2 , la ecuación de la recta (pendiente e intercepto) y el comportamiento de los residuos para verificar la proporcionalidad de la respuesta en todo el rango.	En los 3 días se realizó 1 curva de calibración en diluyente con 6 niveles (0.05–2.50 µg/mL), con 3 réplicas por nivel (0.05; 0.10; 0.25; 0.50; 1.00; 2.50 µg/mL).

Tabla 3. 4 Síntesis del diseño experimental

	EVALUACIÓN	ENSAYO
Precisión (Repetibilidad)	Se determinó la repetibilidad del método en matrices fortificadas (bebida gaseosa y bebida hidratante) a tres niveles de concentración: nivel bajo (0.096 µg/mL), nivel de trabajo (0.496 µg/mL) y nivel alto (2.496 µg/mL), bajo condiciones de mismo analista, mismo día y mismo equipo , expresando la variabilidad como %RSD de la respuesta (área y/o concentración).	Se determinó la repetibilidad del método en bebidas hidratantes y gaseosas a tres niveles bajo, medio, alto. Matriz: bebida hidratante y gaseosa. Concentración: en cada nivel: bajo (0.096 µg/mL), trabajo (0.496 µg/mL) y alto (2.496 µg/mL). Réplicas: 6 por matriz (preparaciones independientes, 1 inyección c/u).
Precisión intermedia	Se evaluó la precisión intermedia del método mediante la variabilidad entre corridas (día/analista) en matrices reales (bebida gaseosa y bebida hidratante), a tres niveles de concentración (bajo 0.096 µg/mL, trabajo 0.496 µg/mL y alto 2.496 µg/mL), manteniendo el mismo sistema cromatográfico. Se expresó como %RSDi y se verificó el efecto de la corrida (día/analista) mediante ANOVA de un factor ($\alpha = 0,05$).	Corridas (día/analista/matriz): 6 (3 días × 2 matrices). Por corrida: 3 niveles (0.096; 0.496 y 2.496 µg/mL). Réplicas: 6 inyecciones por nivel (independientes, 1 inyección c/u). Cálculo: %RSDi por matriz y nivel; comparación entre corridas (día/analista) mediante ANOVA de 1 factor.
Exactitud	Se evaluó la exactitud del método mediante estudios de recuperación en dos matrices reales (bebida hidratante y bebida gaseosa) libres de E127, fortificadas a tres niveles: bajo (0.096 µg/mL), nivel de trabajo (0.496 µg/mL) y alto (2.496 µg/mL).	Matrices gaseosa e hidratante sin E127 fortificadas a 0.096; 0.496 y 2.496 µg/mL. Seis réplicas por nivel y por matriz en un mismo día. Cálculo de %Rec. comparando la concentración obtenida frente a la concentración teórica adicionada.
Robustez	Valoración de la influencia de pequeñas variaciones en siete parámetros operativos e instrumentales sobre la respuesta del método al nivel de trabajo (0.496 µg/mL), mediante un diseño tipo Youden (equivalente a Plackett–Burman de 8 corridas).	Ocho ensayos combinados por matriz según el plan de robustez. Una inyección por ensayo.
Incertidumbre	Se estimará la incertidumbre de medición del resultado de eritrosina por UPLC-DAD mediante un enfoque por componentes, considerando: patrón, preparación de la curva de calibración (regresión) y el desempeño del método (precisión y %recuperación). Se reportará U con k = 2 (=95%).	Recopilar certificados/tolerancias: patrón + pipetas + material volumétrico. Obtener aporte de regresión (curva) y de precisión/recuperación (validación). Calcular $u_{(c)}$ y luego $U = 2 \cdot u_{(c)}$.

e. Procedimiento experimental para cada parámetro de validación

Selectividad

La selectividad del método se comprobó trabajando con dos matrices: bebida hidratante y bebida gaseosa. Para cada una de ellas se registraron los cromatogramas del blanco de diluyente (agua Milli-Q), de la matriz sin fortificar, del estándar de eritrosina y de las matrices fortificadas a un nivel bajo (cercano al LOQ, 0.096 µg/mL) y a un nivel medio (nivel de trabajo, 0.496 µg/mL). Las inyecciones se realizaron bajo las condiciones cromatográficas establecidas y la señal se monitoreó con el detector DAD/PDA a 529 nm.

En cada caso se comparó el tiempo de retención del pico atribuido a la eritrosina con el obtenido para el estándar, verificándose que en los cromatogramas del blanco y de la matriz sin fortificar no aparecieran picos en el tiempo de retención del analito con respuesta significativa. Asimismo, se verificó que en las matrices fortificadas el pico correspondiente se presentara en el mismo tiempo de retención y mantuviera un comportamiento consistente con el estándar. Bajo estos criterios se consideró que el método presentaba selectividad adecuada para la determinación de eritrosina (E127) en las bebidas evaluadas.

Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) del método se estimaron a partir de muestras en matriz fortificadas a un nivel bajo, correspondiente al rango inferior de trabajo de la curva de calibración (0.05–2.50 µg/mL). Para ello, se prepararon y analizaron diez réplicas independientes de bebida gaseosa y diez réplicas independientes de bebida hidratante, ambas libres de E127 y fortificadas a 0.096 µg/mL, las cuales se sometieron a las mismas condiciones del análisis cromatográfico. Las concentraciones se calcularon empleando la curva de calibración establecida para el método y se determinó la desviación estándar en concentración (s_0) para cada matriz. Con base en este parámetro se obtuvieron los valores de LOD y LOQ, expresados en µg/mL.

$$LOD=3s_0 \quad (3.1)$$

$$LOQ=10s_0 \quad (3.2)$$

Donde s_0 es la desviación estándar de las concentraciones obtenidas para las 10 réplicas independientes de la muestra fortificada a 0.096 $\mu\text{g/mL}$ en cada matriz.

Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante curvas de calibración en el rango de 0.05 a 2.50 $\mu\text{g/mL}$ de eritrosina. El estudio se realizó durante tres días independientes, construyendo una curva de calibración por día bajo las mismas condiciones cromatográficas. En cada jornada se trabajó con seis niveles de concentración y se efectuaron tres réplicas por nivel. Con los datos obtenidos se ajustó un modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados y se evaluó el comportamiento de la señal en función de la concentración, de acuerdo con el modelo:

$$y = Sx + b \quad (3.3)$$

Precisión (repetibilidad)

La repetibilidad del método se evaluó por separado para cada matriz de estudio (bebida gaseosa y bebida hidratante). En cada matriz se trabajó en tres niveles de concentración: nivel bajo (0.096 $\mu\text{g/mL}$), nivel de trabajo (0.496 $\mu\text{g/mL}$) y nivel alto (2.496 $\mu\text{g/mL}$), inyectando seis réplicas independientes por nivel en un mismo día, con el mismo analista y el mismo sistema cromatográfico. En ambos casos, la repetibilidad se expresó como el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD_r) de las respuestas obtenidas por matriz y por nivel.

$$\%RSD_r = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.4)$$

Donde SD es la desviación estándar de las seis mediciones y \bar{x} la media correspondiente.

Precisión intermedia

La precisión intermedia del método se evaluó en matrices reales (bebida gaseosa y bebida hidratante) a tres niveles de concentración: nivel bajo (0,096 $\mu\text{g/mL}$), nivel de

trabajo (0,496 µg/mL) y nivel alto (2,496 µg/mL). El estudio se realizó en tres corridas independientes (día/analista), conforme al plan de validación establecido, manteniendo las mismas condiciones instrumentales. En cada corrida se prepararon e inyectaron seis réplicas por matriz y por nivel (preparaciones independientes, 1 inyección c/u). En total se obtuvieron 18 resultados por matriz y por nivel. La precisión intermedia se expresó como porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD_i) calculado a partir de los resultados combinados por matriz y nivel.

$$\%RSD_i = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.5)$$

La distribución de corridas (día/analista), matrices, niveles y número de réplicas considerada en este estudio se presenta en la Tabla

Tabla 3. 5 Plan de validación

PLAN DE VALIDACIÓN					
<i>DIA</i>	<i>ANALISTA</i>	<i>MATRIZ</i>	<i>NIVEL BAJO</i>	<i>NIVEL MEDIO</i>	<i>NIVEL ALTO</i>
1	AN 1	Gaseosa	6 réplicas	6 réplicas	6 réplicas
	AN 1	Bebida hidratante	6 réplicas	6 réplicas	6 réplicas
2	AN 2	Gaseosa	6 réplicas	6 réplicas	6 réplicas
	AN 2	Bebida hidratante	6 réplicas	6 réplicas	6 réplicas
3	AN 1	Gaseosa	6 réplicas	6 réplicas	6 réplicas
	AN 2	Bebida hidratante	6 réplicas	6 réplicas	6 réplicas

Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante ensayos de recuperación en dos matrices reales (bebida hidratante y bebida gaseosa) inicialmente libres de eritrosina (E127), las cuales se fortificaron con el analito a tres niveles de concentración: nivel bajo (0.096 µg/mL), nivel de trabajo (0.496 µg/mL) y nivel alto (2.496 µg/mL). Para cada nivel y cada matriz se prepararon seis réplicas independientes (n = 6), que se sometieron al mismo tratamiento de preparación de muestra y análisis por UPLC-DAD. La exactitud se expresó como porcentaje de recuperación promedio (%Rec), calculado como:

$$\%Rec = \frac{C_{práctica}}{C_{teórica}} \times 100 \quad (3.6)$$

Robustez

La robustez del método se evaluó al nivel de trabajo (2.496 µg/mL) en las matrices de bebida tipo cola y bebida hidratante. Para este estudio se introdujeron pequeñas variaciones deliberadas en siete parámetros operativos del sistema UPLC-DAD: volumen de inyección, flujo, composición de fase móvil isocrática, temperatura de columna, tiempo de agitación manual, tiempo de sonicación y temperatura de autosampler, conforme a los valores alto y bajo establecidos en el plan de robustez. La robustez se evaluó mediante un diseño tipo Youden de ocho ensayos (equivalente a un diseño Plackett-Burman de 8 corridas) para siete factores a dos niveles. Se realizó una inyección por ensayo y las respuestas obtenidas en cada condición combinada se compararon para estimar el efecto de cada parámetro y verificar si las variaciones instrumentales afectan de forma significativa el resultado del análisis.

Tabla 3.6 Plan de robustez

PLAN DE ROBUSTEZ NIVEL DE TRABAJO 2,50 µG/ML				
Asignación	Parámetro	Condición actual	Valor alto	Valor bajo
A,a	Volumen de inyección (ul)	2	2.1	1.9
B,b	Flujo (ml/min)	0.4	0.44	0.36
C,c	Fase móvil isocrática (Acetato de amonio 10 mM: Metanol: Acetonitrilo v/v/v)	50:25:25	49:25.5:25.5	51:24.5:24.5
D,d	Temperatura de columna (°C)	30	32	28
E,e	Tiempo agitación manual (min)	1	1,5	0,5
F,f	Tiempo de sonicación (min)	15	17	13
G,g	Temperatura de ausampler (°C)	20	22	18

Tabla 3.7 Distribución de experimentos por parámetros

Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

$$X_{\max} - x_{\min} < \sqrt{2} \cdot SD \quad (3.7)$$

Tabla 3.8 Objetivos de validación

CRITERIO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Selectividad / Especificidad	<p>Blanco del diluyente y matriz sin fortificar: no debe observarse un pico con respuesta significativa en el tiempo de retención (RT) del analito (zona RT del estándar $\pm 2\%$).</p> <p>Matriz fortificada al nivel bajo (0,096 $\mu\text{g/mL}$): el pico de eritrosina debe ser detectable y definible en el RT esperado (RT muestra dentro de $\pm 2\%$ respecto al RT del estándar).</p> <p>Matriz fortificada al nivel medio (0,496 $\mu\text{g/mL}$): el pico de eritrosina debe ser definido y presentarse en el RT esperado (RT muestra dentro de $\pm 2\%$ respecto al estándar).</p> <p>Resolución cromatográfica (Rs): si la matriz presenta un pico adyacente cercano al analito, la resolución deberá ser $R_s \geq 1,5$.</p> <p>Confirmación espectral (PDA/DAD): el máximo de absorción del analito ($\lambda_{\text{máx}}$) deberá ser 529 ± 2 nm respecto al estándar.</p>
Límite de detección	<p style="text-align: center;">$\text{LOD}=3s_0$</p> <p>*desviación estándar de las concentraciones obtenidas en 10 réplicas independientes de la matriz fortificada al nivel más bajo de la curva (0,096 $\mu\text{g/mL}$)</p>
Límite de cuantificación	<p style="text-align: center;">$\text{LOQ}=10s_0$</p> <p>*desviación estándar de las concentraciones obtenidas en 10 réplicas independientes de la matriz fortificada al nivel más bajo de la curva (0,096 $\mu\text{g/mL}$).</p>
Linealidad	<p style="text-align: center;">$R^2 \geq 0.995$.</p> <p style="text-align: center;">$F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}} (\alpha=0.05)$.</p> <p style="text-align: center;">Residuos sin tendencia (distribución aleatoria)</p> <p style="text-align: center;">0,05–2,50 $\mu\text{g/mL}$</p>
Precisión (Repetibilidad)	<p style="text-align: center;">Nivel bajo (0,096 $\mu\text{g/mL}$): $\text{RSDr} \leq 5 \%$</p> <p style="text-align: center;">Nivel de trabajo (0,496 $\mu\text{g/mL}$): $\text{RSDr} \leq 5 \%$</p> <p style="text-align: center;">Nivel alto (2,496 $\mu\text{g/mL}$): $\text{RSDr} \leq 5 \%$</p>
Precisión intermedia	<p style="text-align: center;">Nivel bajo (0,096 $\mu\text{g/mL}$): $\text{RSDi} \leq 8 \%$</p> <p style="text-align: center;">Nivel de trabajo (0,496 $\mu\text{g/mL}$): $\text{RSDi} \leq 8 \%$</p> <p style="text-align: center;">Nivel alto (2,496 $\mu\text{g/mL}$): $\text{RSDi} \leq 8 \%$</p>
Exactitud	<p style="text-align: center;">Nivel bajo (0,096 $\mu\text{g/mL}$): %Recuperación = 80–120 %</p> <p style="text-align: center;">Nivel de trabajo (0,496 $\mu\text{g/mL}$): %Recuperación = 90–110 %</p> <p style="text-align: center;">Nivel alto (2,496 $\mu\text{g/mL}$): %Recuperación = 90–110 %</p>
Robustez	<p>$\text{RSD} \leq 5 \%$ dentro de cada condición ($n=6$).</p>
Incertidumbre	<p>Incertidumbre expandida (U) $\leq \pm 10 \%$ del valor medido.</p>

3.4. Recursos

3.4.1 Reactivos

Tabla 3.9 Lista de reactivos

Reactivo	Pureza/Grado	Marca
Metanol grado UPLC	99%	Fisher Chemical
Acetonitrilo grado UPLC	99%	Fisher Chemical
Acetato de amonio	98%	LobaChemie
Agua ultrapura (agua Milli-Q)	Agua ultrapura tipo I	N/A
Eritrosina B- estándar primario	99.10%	Sigma Aldrich
Eritrosina B- estándar secundario	90%	Sigma Aldrich

3.4.2 Equipos

Tabla 3.10 Lista de equipos

Equipo	Descripción
Sistema UPLC / DAD	UPLC con detector DAD
Columna cromatográfica	Columna UPLC BEH, 2.1 × 100 mm, 1.7 µm
Baño ultrasonido	40 kHz para disolver/desgasificar soluciones
Balanza analítica	Resolución 0.1 mg, capacidad
Sistema de purificación de agua	Producción de agua ultrapura tipo Milli-Q

3.4.2 Materiales

Tabla 3.11 Lista de materiales

Equipo	Descripción
Punta de micropipetas	Puntas desechables
Vidrio reloj	Pesar estándar primario
Espátula	Acero inoxidable (micro espátula)
Matraces aforados	10 ml (6 unidades) - 25ml (6 unidades)
Micropipetas	Rango 10-100ul y 100-1000ul
Viales	Tipo ámbar
tapas	Con septum PTFE/silicona
Frascos ámbar	Guardar soluciones
Filtro de jeringa Nylon	0.45 um
Rotulador	Escribir descripción en las etiquetas

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante la validación del método UPLC-DAD para la determinación de eritrosina (E127) se realizó sobre variables cuantitativas continuas (áreas de pico, concentraciones calculadas, %RSD, %recuperación y parámetros de regresión). El tratamiento estadístico se ejecutó con apoyo de Microsoft Excel mediante la función “Análisis de datos”, y el uso de fórmulas de cálculo para cada parámetro de validación, de acuerdo con el diseño experimental establecido en esta investigación

a) Estadística descriptiva

Se aplicó estadística descriptiva para resumir y presentar los resultados por matriz y por nivel de concentración, priorizando la variabilidad de las mediciones. En los ensayos de precisión, la dispersión de los resultados se evaluó mediante desviación estándar y %RSD a partir de las réplicas realizadas, con el fin de evidenciar la consistencia del método bajo las condiciones evaluadas.

En los ensayos de exactitud, los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación por nivel de concentración, con el propósito de evidenciar el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor teórico de fortificación.

Adicionalmente, se determinaron frecuencias de cumplimiento (n y %) frente a los criterios de aceptación definidos (por ejemplo, límites de %RSD y rangos de recuperación), para evidenciar el desempeño global del método en las condiciones de trabajo establecidas.

b) Estadística inferencial

Se emplearon procedimientos inferenciales porque el objetivo del estudio no solo fue describir los resultados, sino verificar, con base estadística, el cumplimiento de los parámetros de desempeño del método. Para ello, se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) y se aplicaron pruebas de hipótesis orientadas a comparar condiciones y a sustentar decisiones sobre el desempeño del procedimiento analítico.

La precisión intermedia se evaluó mediante ANOVA de un factor, considerando como grupos las corridas definidas por la combinación día–analista, a fin de identificar posibles diferencias significativas entre condiciones. La linealidad se evaluó mediante regresión

lineal por mínimos cuadrados entre la concentración teórica y la respuesta instrumental (área de pico), reportándose los parámetros del modelo (pendiente e intercepto), el coeficiente de determinación (R^2) y la significancia del ajuste mediante el ANOVA de la regresión, conforme a los criterios de aceptación establecidos.

El procesamiento, organización y análisis de la información se realizó en Microsoft Excel, empleando fórmulas de cálculo y la herramienta “Análisis de datos” para la estimación de regresión y ANOVA. Esto permitió gestionar la base de datos generada, estandarizar los cálculos y obtener los estadísticos necesarios para la interpretación de resultados y la verificación del cumplimiento de los criterios establecidos.

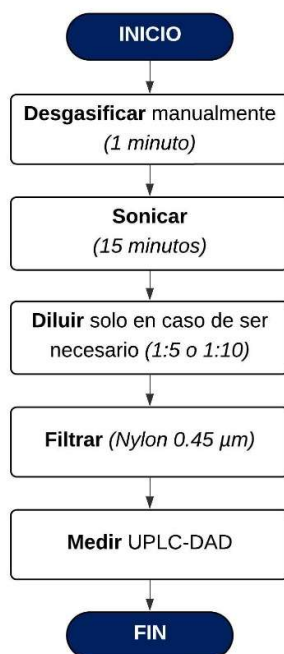


Figura 3.1 Diagrama de flujo de proceso

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Los resultados presentados en este capítulo corresponden al tratamiento y análisis de los datos experimentales obtenidos durante el desarrollo y validación del método analítico por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos (UPLC-DAD) para la determinación de eritrosina (E127) en bebidas de consumo humano.

Los ensayos realizados permitieron evaluar el desempeño del método bajo las condiciones establecidas, de acuerdo con los lineamientos de la norma ISO/IEC 17025:2017 y las recomendaciones de la guía EURACHEM. En este sentido, se reportan de manera sistemática los resultados correspondientes a los parámetros de validación analítica, incluyendo selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud, robustez e incertidumbre de medida.

La presentación de los resultados se organizó mediante tablas, figuras y análisis estadísticos, con el fin de evidenciar el comportamiento del método frente a las matrices evaluadas y su desempeño dentro del rango de trabajo definido para la cuantificación de eritrosina en bebidas gaseosas e hidratantes.

4.1 Procedimiento UPLC-DAD para eritrosina en bebidas: diseño cromatográfico e identificación

En esta etapa se contó con un procedimiento cromatográfico mediante UPLC para la identificación y cuantificación de eritrosina en matrices de bebidas de consumo humano, el cual sirvió como base operativa para la ejecución de los ensayos posteriores y la obtención de los datos presentados en este capítulo. Este procedimiento reunió de forma estructurada las condiciones instrumentales del sistema, los pasos de preparación de soluciones y estándares, así como el tratamiento de las muestras previo al análisis. Para evitar extender el cuerpo del capítulo con información operativa detallada, el procedimiento completo se incluyó en los Anexos del presente trabajo (Apéndice A), donde se presenta en formato de documento técnico.

De acuerdo con Xie (2022), reportó para bebidas un enfoque más complejo, que incluyó elución en gradiente con acetonitrilo y acetato de amonio (0,02 mol/L), ajuste de pH, extracción ultrasónica (30 min) y filtración a 0,20 µm. En contraste, el procedimiento desarrollado priorizó una preparación directa (desgasificación y filtración) y condiciones orientadas a la rutina, controlando puntos críticos observables como espuma, turbidez y necesidad de dilución.

Esta decisión permitió contar con un flujo de trabajo viable y estandarizado para el laboratorio sin incorporar etapas adicionales cuando la matriz lo permite. La importancia del procedimiento radicó en que aseguró consistencia operativa entre analistas y corridas, sirviendo como base para la generación confiable de los resultados y para futuras ampliaciones o etapas posteriores del estudio.

La elaboración del procedimiento no solo definió el flujo técnico de toma/preparación y análisis, sino que también incorporó aspectos alineados con ISO/IEC 17025:2017, en particular: recepción e identificación de la muestra (verificación de integridad, registro de datos y etiquetado), generación de registros técnicos (lote/condiciones del estándar, cálculos, factor de dilución y observaciones), control interno durante la secuencia mediante QC con criterio de aceptación, y control documental mediante realización revisión aprobación, versión y control de cambios.

4.2 Desempeño y validación analítica del método UPLC-DAD: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, LOD/LOQ e incertidumbre

Se evaluó el desempeño del método desarrollado mediante la determinación de los parámetros de validación analítica establecidos para este estudio. Para ello, se realizaron los ensayos correspondientes y se procesaron los datos obtenidos con el fin de verificar, frente a criterios de aceptación definidos, la capacidad del método para identificar y cuantificar eritrosina (E127) en las matrices evaluadas. En los apartados siguientes se presentan de forma organizada los resultados asociados a selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, e incertidumbre de medición.

4.2.1 Evaluación preliminar del desempeño cromatográfico del método

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante el establecimiento de las condiciones instrumentales iniciales del método UPLC-DAD y la evaluación preliminar de

la respuesta de eritrosina en estándar y en la matriz evaluada. Esta etapa permitió definir parámetros operativos consistentes y establecer referencias para la identificación del analito en los ensayos posteriores de validación.

Para el inicio del desarrollo del método se utilizaron los datos descritos en la tabla 3.2, se trabajó en modo isocrático con una fase móvil compuesta por acetato de amonio (A), metanol (B) y acetonitrilo (D) en proporción 50:25:25 (v/v), utilizando un flujo de 0,40 mL/min y un tiempo total de corrida de 4,0 min. La temperatura de la columna se fijó en 30 °C y la del compartimiento de muestras en 20 °C. La detección se realizó mediante arreglo de diodos (DAD) en modo absorbancia, seleccionándose una longitud de onda de 529 nm para el seguimiento del analito.

Bajo estas condiciones, se evaluó la respuesta cromatográfica del estándar de eritrosina, observándose un pico principal definido con un tiempo de retención aproximado de 1,57 min, el cual se consideró como referencia para la identificación del analito en corridas posteriores Figura 4.1. Adicionalmente, en la matriz evaluada no se evidenciaron señales con interferencia directa en la ventana cromatográfica del analito durante esta etapa preliminar.

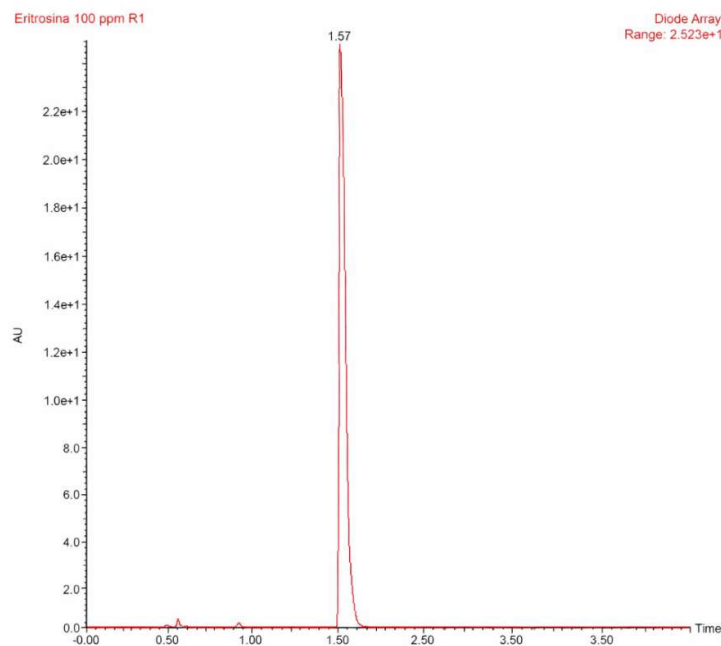


Figura 4.1 Cromatograma del estándar de eritrosina (E127) bajo condiciones iniciales

Con el fin de resumir el procedimiento de trabajo y la lógica de la validación, la Figura 4.3 muestra el flujo general desde la preparación de soluciones y muestras hasta la evaluación de los parámetros analíticos.

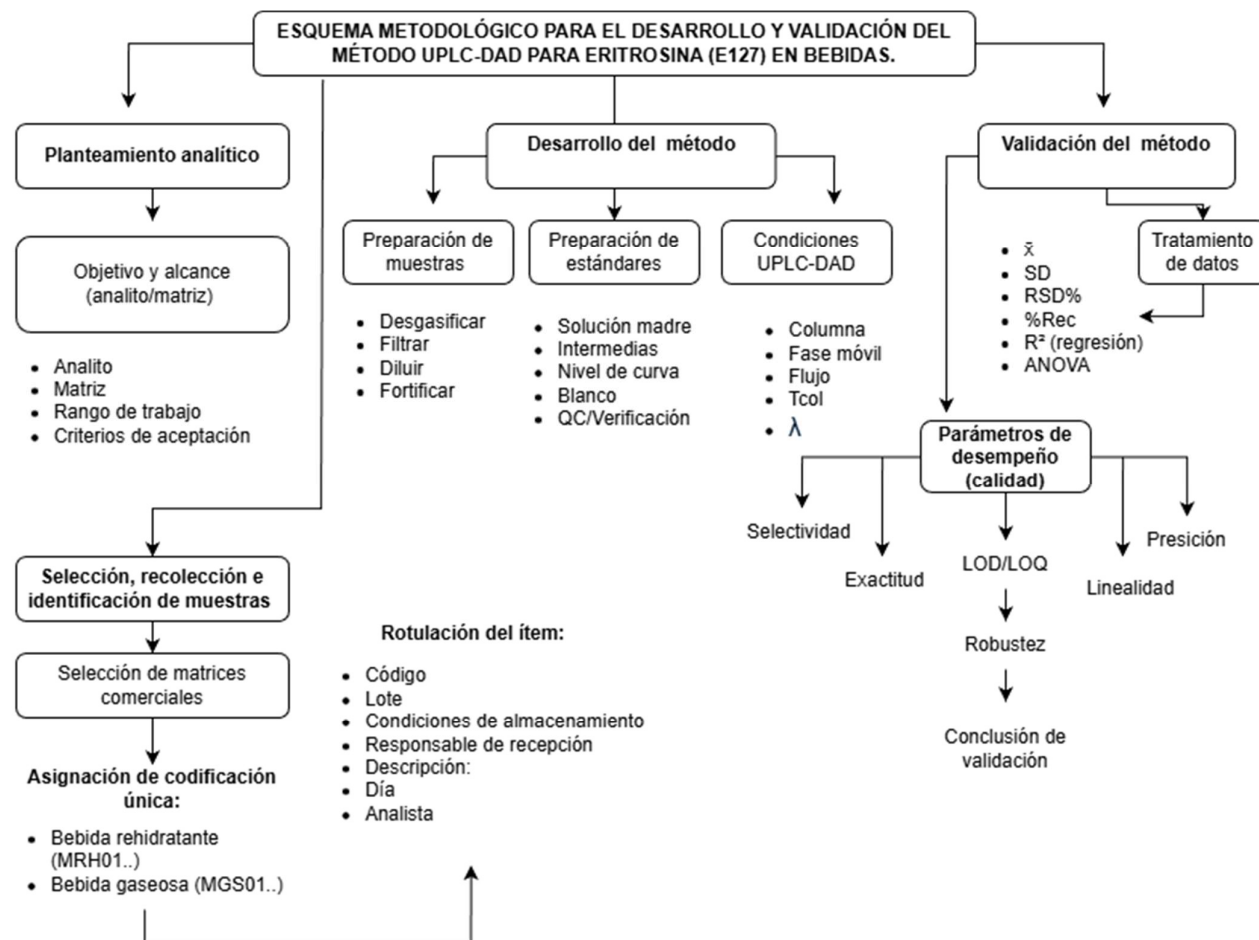


Figura 4.2 Esquema metodológico del desarrollo del método

4.2.2 Resultados de validación

4.2.2.1 Selectividad

La selectividad del método UPLC-DAD para la determinación de eritrosina (E127) se comprobó en dos matrices de bebidas comerciales (bebida gaseosa y bebida hidratante). Para cada matriz se registraron los cromatogramas del blanco del diluyente (agua Milli-Q), de la matriz sin fortificar, de matrices fortificadas a un nivel bajo cercano al LOQ (0.096 $\mu\text{g/mL}$) y a un nivel medio de trabajo (0.496 $\mu\text{g/mL}$), además del estándar de

eritrosina. La adquisición se realizó con detector PDA/DAD a 529 nm bajo las condiciones cromatográficas establecidas.

En los cromatogramas del blanco del diluyente y de la matriz sin fortificar no se observaron picos con respuesta significativa en la ventana correspondiente al tiempo de retención del analito (RT del estándar $\pm 2\%$). En las matrices fortificadas se evidenció un pico atribuible a eritrosina en el tiempo de retención esperado, consistente con el estándar (variación de RT dentro de $\pm 2\%$). Debido a que no se presentaron picos adyacentes cercanos al analito en la ventana evaluada, no fue necesario calcular la resolución cromatográfica (R_s). Con base en estos criterios se detallaron los resultados de la tabla

Tabla 4.1 Resultados de selectividad

Matriz	Condición	Nivel (µg/mL)	RT (min)	ΔRT vs estándar (%)	Interferencia en RT (Sí/No)	Criterio de aceptación	Criterio cumple (Sí/No)
<i>Agua Milli Q</i>	Blanco de diluyente	N/A	N/A	N/A	NO	Sin pico en RT del analito	SI
<i>Bebida tipo gaseosa</i>	Matriz sin fortificar	N/A	N/A	N/A	NO	Sin pico en RT del analito	SI
<i>Bebida tipo gaseosa</i>	Matriz fortificada	0.096 ug/ml	1.372	0.513	NO	$RT \leq \pm 2\%$ vs estándar	SI
<i>Bebida tipo gaseosa</i>	Matriz fortificada	0.496 ug/ml (nivel trabajo)	1.368	0.22	NO	$RT \leq \pm 2\%$ vs estándar	SI
<i>Estándar de eritrosina</i>	Estándar del analito	0.496 ug/ml	1.365	Referencia	N/A	Referencia (RT y $\lambda_{m\acute{a}x}$)	N/A
<i>Agua Milli Q</i>	Blanco de diluyente	N/A	N/A	N/A	NO	Sin pico en RT del analito	SI
<i>Bebida hidratante</i>	Matriz sin fortificar	N/A	N/A	N/A	NO	Sin pico en RT del analito	SI
<i>Bebida hidratante</i>	Matriz fortificada	0.096 ug/ml	1.372	0.513	NO	$\Delta RT \leq \pm 2\%$ vs estándar	SI
<i>Bebida hidratante</i>	Matriz fortificada	0.496 ug/ml (nivel trabajo)	1.371	0.44	NO	$\Delta RT \leq \pm 2\%$ vs estándar	SI
<i>Estándar de eritrosina</i>	Estándar del analito	0.496 ug/ml	1.365	Referencia	N/A	Referencia (RT y $\lambda_{m\acute{a}x}$)	N/A

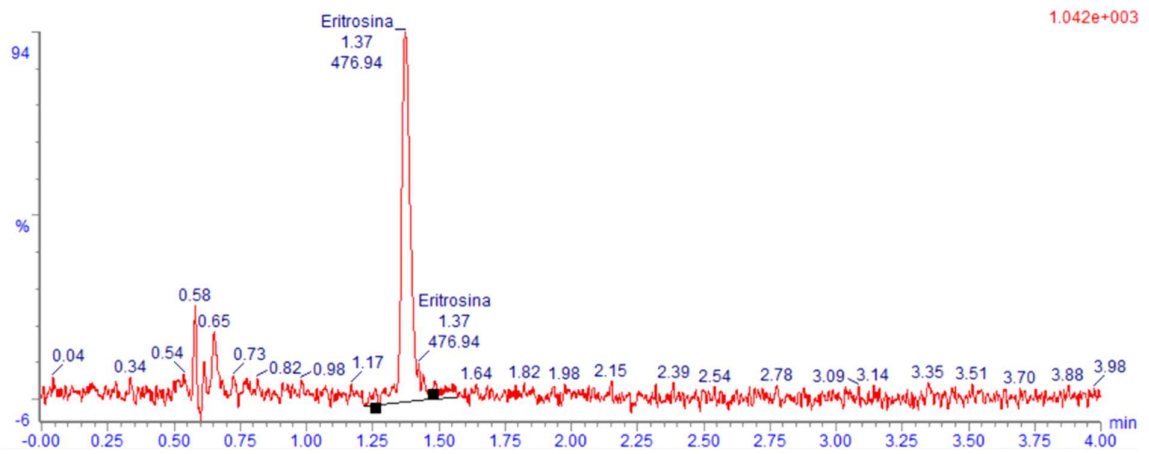


Figura 4.3 Cromatograma de gaseosa fortificada a 0.096 µg/mL

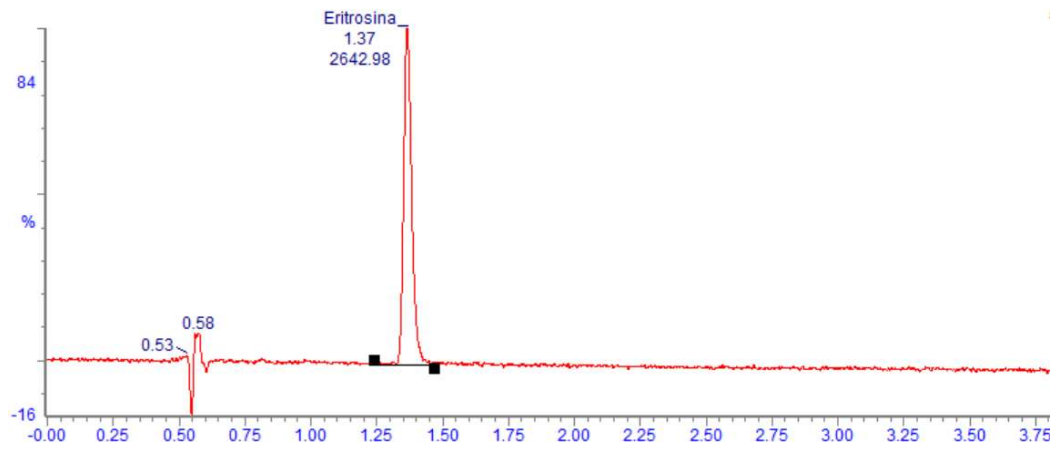


Figura 4.4 Cromatograma de bebida hidratante fortificada a 0.496 µg/mL

4.2.2.2 Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) del método UPLC-DAD se estimaron empleando réplicas en matriz fortificada a un nivel bajo (0,096 µg/mL), correspondiente al extremo inferior del rango de trabajo de la curva de calibración. Para ello, se analizaron diez réplicas independientes (n = 10) por matriz (bebida hidratante y bebida gaseosa), bajo las condiciones cromatográficas establecidas.

Las concentraciones se calcularon utilizando la curva de calibración del método y, a partir de la variabilidad obtenida en este nivel, se estimaron los valores de LOD y LOQ conforme a las expresiones establecidas (ver Ecuación (3.1) y Ecuación (3.2)). Los resultados para cada matriz se presentan en la Tabla 4.2, mientras que los datos individuales de área y concentración utilizados para el cálculo se incluyen en el Apéndice B (Tabla B.1).

Tabla 4.2 LOD y LOQ de eritrosina (E127) por UPLC-DAD

Matriz	Nivel usado (µg/mL)	n	Pendiente S	S ₀ (SD de concentración)	S _y (SD de áreas)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
<i>Bebida hidratante</i>	0.0960	10	494.2070	0.0064	3.1715	0.0193	0.0642
<i>Bebida gaseosa</i>	0.0960	10	494.2070	0.0039	1.9314	0.0117	0.0391

En términos de sensibilidad el procedimiento permitió trabajar con concentraciones muy bajas de eritrosina, evidenciando una alta sensibilidad analítica, y además generó resultados consistentes en matrices de bebidas. Los LOQ obtenidos en este estudio son comparables e incluso inferiores al rango de LOQ reportado en validaciones multiclorante por HPLC-DAD (0,077–0,262 µg/mL) (Palianskikh et al., 2022).

En matrices líquidas complejas, como cócteles premezclados, también se han descrito recuperaciones de 75,01–114,45% y valores de precisión inter-día (RSD) de 0,89–5,44%, lo que permite contextualizar que los rangos de precisión y recuperación alcanzados por el método se encuentran dentro de lo esperable para técnicas cromatográficas con DAD/PDA (Ma et al., 2025).

4.2.2.3 Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante curvas de calibración externas en el rango de 0.05–2.50 µg/mL de eritrosina. El estudio se realizó durante tres días independientes, construyéndose una curva de calibración por día bajo las mismas condiciones cromatográficas. En cada jornada se trabajó con seis niveles de concentración y se efectuaron tres réplicas por nivel.

Los datos experimentales se ajustaron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, de acuerdo con el modelo lineal establecido (ver Ecuación 3.3). La evaluación incluyó el coeficiente de determinación (R^2), la verificación de la significancia del modelo mediante la prueba F ($\alpha = 0.05$), la estimación de pendiente e intercepto con sus errores asociados, y el análisis del comportamiento de los residuos. Los parámetros resumidos de cada curva se presentan en la Tabla 4.3, mientras que los resultados individuales obtenidos por día se incluyen en el Apéndice C.

Tabla 4.3 Parámetros de regresión para la evaluación de la linealidad

Curva de calibración	Pendiente	Intercepto	Coeficiente de determinación	Error estándar de la pendiente	Error estándar del intercepto
	S	b	R^2	Sm	Sb
Curva Día 1	493.5833	0.8603	0.9970	13.6039	15.2855
Curva Día 2	501.6288	-9.6560	0.9995	5.4860	6.1641
Curva Día 3	479.1823	1.7949	0.9992	6.5641	7.3755

4.2.2.4 Precisión

4.2.2.4.1 Repetibilidad

La repetibilidad del método se evaluó en dos matrices de estudio (bebida hidratante y bebida gaseosa) a tres niveles de concentración: bajo (0.096 µg/mL), medio (0.496 µg/mL) y alto (2.496 µg/mL), bajo condiciones intra-día. En cada nivel se analizaron seis réplicas independientes, manteniéndose constantes el analista, el equipo y las condiciones cromatográficas. La variabilidad de las respuestas se expresó como porcentaje de desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (%RSD_r).

Durante los tres días de evaluación, los valores de %RSD_r obtenidos para ambas matrices y en todos los niveles de concentración se mantuvieron dentro del criterio de aceptación establecido (%RSD_r ≤ 5 %). En el nivel bajo, los rangos de %RSD_r se situaron entre 3.343 y 4.236 %; en el nivel medio variaron entre 2.731 y 4.343 %; y en el nivel alto entre 1.644 y 3.100 % (Tabla 4.4). En conjunto, se observó una mayor dispersión relativa en el nivel bajo, con disminución en los niveles medio y alto, conforme a lo esperado para métodos cuantitativos.

Tabla 4.4 Repetibilidad por día y nivel de concentración

Evaluación	%RSD nivel bajo	%RSD nivel medio	%RSD nivel alto	Criterio	Cumple
Día 1	3.956–4.236 %	2.731–3.961 %	3.086–3.100 %	%RSD _r ≤ 5%	Sí
Día 2	3.673–4.128 %	3.064–3.267 %	1.644–2.543 %	%RSD _r ≤ 5%	Sí
Día 3	3.343–3.834 %	3.834–4.334 %	2.297–3.075 %	%RSD _r ≤ 5%	Sí
General (días 1–3)	3.343–4.128 %	2.731–4.334 %	1.644–3.100 %	%RSD_r ≤ 5%	Sí

Al analizar la repetibilidad por matriz, la bebida hidratante presentó rangos de %RSD_r de 3.343–4.128 %, 3.064–3.961 % y 1.644–3.086 % para los niveles bajo, medio y alto, respectivamente. Por su parte, la bebida gaseosa mostró rangos de 3.673–4.236 %, 2.731–4.343 % y 2.543–3.100 % en los mismos niveles. En todos los casos, la variabilidad se mantuvo dentro del límite establecido, evidenciando un comportamiento consistente del método bajo condiciones de repetibilidad (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Repetibilidad por matriz y nivel

Evaluación (nivel)	Concentración teórica (µg/mL)	Hidratante – %RSD (rango días 1–3)	Gaseosa – %RSD (rango días 1–3)	Criterio	Cumple
Bajo	0.0960	3.343 – 4.128 %	3.673 – 4.236 %	%RSD _r ≤ 5%	Sí
Medio	0.4960	3.064 – 3.961 %	2.731 – 4.334 %	%RSD _r ≤ 5%	Sí
Alto	2.4960	1.644 – 3.086 %	2.543 – 3.100 %	%RSD _r ≤ 5%	Sí

4.2.2.4.2 Precisión intermedia

El diseño experimental empleado para la evaluación de la precisión intermedia en bebida gaseosa y bebida hidratante consideró tres grupos correspondientes a corridas día/analista y seis determinaciones por grupo, aplicándose el mismo esquema para los niveles bajo, medio y alto.

Tabla 4.6 Parámetros y grados de libertad precisión intermedia.

Parámetro	Descripción	Símbolo	Valor
Número de grupos	(Corridas día/analista)	k	3
Tamaño de grupo	(Réplicas por corrida)	p	6
Grados de libertad	Dentro del grupo	v	$p - 1 (= 5)$

Como parte del tratamiento estadístico, se obtuvo el resumen descriptivo por corrida (día/analista) para cada nivel de concentración, incluyendo el número de determinaciones (n), la suma, el promedio y la varianza. Estos estadísticos constituyen la base para la evaluación de la precisión intermedia y el posterior análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 4.7 Corrida (día/analista) Matriz bebida gaseosa

Nivel	Matriz	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bajo	Gaseosa	DÍA 1-AN1	6	0.5198	0.0866	1.35E-05
		DÍA 2-AN2	6	0.5846	0.0974	1.28E-05
		DÍA 3-AN2	6	0.5660	0.0943	1.31E-05
Medio	Gaseosa	DÍA 1-AN1	6	2.9176	0.4863	0.0002
		DÍA 2-AN2	6	2.9164	0.4861	0.0003
		DÍA 3-AN2	6	2.9171	0.4862	0.0004
Alto	Gaseosa	DÍA 1-AN1	6	14.6510	2.4418	0.0057
		DÍA 2-AN2	6	14.7744	2.4624	0.0039
		DÍA 3-AN2	6	14.7406	2.4568	0.0057

Con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las corridas (día/analista) en cada nivel de concentración, se aplicó un ANOVA de un factor, considerando como factor la corrida (día/analista). En la Tabla 4.8 se presentan la suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrados medios, el estadístico F, el p-valor

(probabilidad) y el valor crítico de F para $\alpha = 0,05$, utilizados para la toma de decisión respecto a la hipótesis nula.

Tabla 4.8 ANOVA de un factor bebida gaseosa

Nivel	Matriz	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Bajo	Gaseosa	Entre grupos	0.0004	2	0.0002	14.1456	0.0004	3.6823
		Dentro de los grupos	0.0002	15	0.0000			
		Total	0.0006	17				
Medio Gaseosa	Gaseosa	Entre grupos	1.24E-07	2	6.19E-08	0.0002	0.9998	3.6823
		Dentro de los grupos	0.0046	15	0.0003			
		Total	0.0046	17				
Alto Gaseosa	Gaseosa	Entre grupos	0.0014	2	0.0007	0.1324	0.8770	3.6823
		Dentro de los grupos	0.0768	15	0.0051			
		Total	0.0782	17				

Como parte del tratamiento estadístico, se obtuvo el resumen descriptivo por corrida (día/analista) para cada nivel de concentración en la matriz bebida hidratante, incluyendo el número de determinaciones (n), la suma, el promedio y la varianza. Estos estadísticos constituyen la base para la evaluación de la precisión intermedia y el posterior análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 4.9 Corrida (día/analista) Matriz bebida hidratante

Nivel	Matriz	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bajo	Hidratante	DÍA1-AN1	6	0.5365	0.0894	1.25E-05
		DÍA 2-AN2	6	0.5415	0.0903	1.39E-05
		DÍA3-AN1	6	0.5454	0.0909	9.24E-06
Medio	Hidratante	DÍA1-AN1	6	2.9427	0.4905	0.0004
		DÍA 2-AN2	6	2.8211	0.4702	0.0002
		DÍA3-AN1	6	2.8565	0.4761	0.0003
Alto	Hidratante	DÍA1-AN1	6	15.0191	2.5032	0.0060
		DÍA 2-AN2	6	14.9457	2.4909	0.0017
		DÍA3-AN1	6	14.7967	2.4661	0.0032

Con el fin de evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las corridas (día/analista) en la matriz bebida hidratante, se aplicó un ANOVA de un factor para cada nivel de concentración (bajo, medio y alto), considerando como factor la

corrida (día/analista). En la Tabla 4.10 se presentan la suma de cuadrados, los grados de libertad, los cuadrados medios, el estadístico F, el p-valor (probabilidad) y el valor crítico de F ($\alpha = 0,05$), utilizados para la toma de decisión respecto a la hipótesis nula.

Tabla 4.10 ANOVA de un factor bebida hidratante

Nivel	Matriz	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Bajo	Hidratante	Entre grupos	6.64E-06	2	3.32E-06	0.2795	0.7600	3.6823
		Dentro de los grupos	0.0002	15	1.19E-05			
		Total	0.0002	17				
Medio	Hidratante	Entre grupos	0.0013	2	0.0007	2.1330	0.1530	3.6823
		Dentro de los grupos	0.0046	15	0.0003			
		Total	0.0059	17				
Alto	Hidratante	Entre grupos	0.0043	2	0.0021	0.5916	0.5659	3.6823
		Dentro de los grupos	0.0543	15	0.0036			
		Total	0.0585	17				

En cuanto a la precisión intermedia, los resultados obtenidos en bebidas (%RSDi 2,42–4,05% en hidratante y 2,92–7,19% en gaseosa) se mantienen en rangos comparables a los reportados en matrices más complejas donde también se determinan colorantes, como productos de confitería. Por ejemplo, en un método UPLC-PDA aplicado a jelly y gummy candy se informaron recuperaciones entre 81,4–97,5% y valores de precisión (RSD%) que se ubican en rangos de 0,90–8,74% (intra-día) y 3,36–9,62% (inter-día), lo que se solapa con el comportamiento observado en este estudio, especialmente considerando que en niveles bajos suele aumentar la variabilidad relativa (Yang et al., 2014).

4.2.2.5 Exactitud

En el día 1, la exactitud del método, expresada como %REC promedio (n=6), cumplió los criterios de aceptación en ambas matrices (hidratante y gaseosa) y en los tres niveles evaluados. Las recuperaciones promedio se ubicaron entre 90.239–90.868% (bajo), 98.036–98.352% (medio) y 97.830–100.773% (alto).

En el día 2, se mantuvo el cumplimiento de exactitud para todos los niveles y matrices. El %REC promedio estuvo entre 93.358–101.489% (bajo), 93.350–97.700% (medio) y 98.654–101.940% (alto), evidenciando resultados consistentes dentro de los rangos establecidos.

En el día 3, los resultados también cumplieron los criterios de aceptación en ambos tipos de matriz y niveles. Las recuperaciones promedio se encontraron entre 92.311–98.261% (bajo), 90.680–98.022% (medio) y 98.066–98.428% (alto), manteniendo la exactitud dentro del límite establecido.

Tabla 4.11 %REC por día (bajo, medio y alto).

<i>Evaluación</i>	%REC nivel bajo	%REC nivel medio	%REC nivel alto	Criterio	Cumple
<i>Día 1</i>	90.239–90.868 %	98.036–98.352 %	97.830–100.773 %	Bajo: 80–120% Medio/Alto: 90–110%	Sí
<i>Día 2</i>	93.358–101.489 %	93.350–97.700 %	98.654–101.940 %	Bajo: 80–120% Medio/Alto: 90–110%	Sí
<i>Día 3</i>	92.311–98.261 %	90.680–98.022 %	98.066–98.428 %	Bajo: 80–120% Medio/Alto: 90–110%	Sí
General (días 1–3)	90.239–101.489 %	90.680–98.352 %	97.830–101.940 %	Bajo: 80–120% Medio/Alto: 90–110%	Sí

Con base en el cuadro resumen por nivel y matriz, se confirma que la exactitud del método fue adecuada durante los tres días de evaluación, ya que tanto en la matriz hidratante como en la gaseosa los valores de %REC promedio se mantuvieron dentro de los criterios de aceptación establecidos para los niveles bajo (0.096 µg/mL), medio (0.496 µg/mL) y alto (2.496 µg/mL). En conjunto, los rangos observados evidencian un desempeño consistente del método en términos de recuperación, por lo que se concluye que cumple con el requisito de exactitud.

Tabla 4.12 %REC por nivel y matriz (días 1–3).

Evaluación (nivel)	Concentración teórica (µg/mL)	Hidratante – %REC (rango días 1–3)	Gaseosa – %REC (rango días 1–3)	Criterio	Cumple
Bajo	0.096	90.868–93.358 %	90.239–101.489 %	80–120 %	Sí
Medio	0.496	90.680–98.352 %	97.700–98.036 %	90–110 %	Sí

Alto	2.496	98.066–101.940 %	97.830–98.654 %	90–110 %	Sí
-------------	-------	------------------	-----------------	----------	----

4.2.2.6 Robustez

Para evaluar la robustez del método se aplicó un diseño de variación deliberada de parámetros, en el que se modificaron en dos niveles (alto y bajo) siete condiciones operativas (A–G), incluyendo: volumen de inyección, flujo, composición de fase móvil, temperatura de columna, tiempo de agitación manual, tiempo de sonicación y temperatura del autosampler. Para cada factor se calculó la respuesta promedio cuando el parámetro estuvo en nivel alto (X) y en nivel bajo (x), y se determinó la diferencia absoluta $|X-x|$. La aceptación se estableció comparando dicha diferencia con el umbral definido para el estudio (ver Ecuación 3.7), clasificándose como “ROBUSTO” cuando la diferencia se mantuvo dentro del criterio y como “SENSIBLE A VARIACIÓN” cuando lo excedió. A continuación, se presentan los resultados para la matriz bebida hidratante ya la matriz bebida gaseosa.

Tabla 4.13 Robustez bebidas hidratantes

Observaciones	Parámetro	Parámetro	(X) (Alto)	(x) (Bajo)	Diferencia $ X-x $	Criterio (X-x) $< \sqrt{2}$ DS	Clasificación	
2.4646	A,a	Vol. inyección (μL)	1.6076	1.4435	0.1641	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN	
2.4148	B,b	Flujo (mL/min)	1.4410	1.6102	0.1692	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN	
2.4477	C,c	Composición de fase móvil	1.5350	1.5161	0.0189	CUMPLE	ROBUSTO	
2.5469	D,d	Temperatura de columna (°C)	1.5844	1.4668	0.1176	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN	
2.4043	E,e	Tiempo de agitación manual (min)	1.5172	1.5340	0.0168	CUMPLE	ROBUSTO	
2.5183	F,f	Tiempo de sonicación (min)	1.5452	1.5059	0.0393	CUMPLE	ROBUSTO	
SD	0.0566	G,g	Temperatura de autosampler (°C)	1.5468	1.5044	0.0424	CUMPLE	ROBUSTO
$L = \sqrt{2}$ DS	0.0801							

Tabla 4.14 Robustez bebidas gaseosas

Observaciones	Parámetro	Parámetro	(X) (Alto)	(x) (Bajo)	Diferencia X-x	Criterio (X-x) < $\sqrt{2}$ DS	Clasificación	
2.3283	A,a	Vol. inyección (μ L)	1.9758	1.7523	0.2235	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN	
2.4466	B,b	Flujo (mL/min)	1.6082	2.1199	0.5116	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN	
2.5394	C,c	Composición de fase móvil	1.8856	1.8425	0.0431	CUMPLE	ROBUSTO	
2.4637	D,d	Temperatura de columna ($^{\circ}$ C)	1.8539	1.8742	0.0204	CUMPLE	ROBUSTO	
2.5253	E,e	Tiempo de agitación manual (min)	1.9546	1.7735	0.1811	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN	
2.4374	F,f	Tiempo de sonicación (min)	1.8802	1.8479	0.0324	CUMPLE	ROBUSTO	
SD	0.0756	G,g	Temperatura de autosampler ($^{\circ}$ C)	1.7554	1.9727	0.2174	NO CUMPLE	SENSIBLE A VARIACIÓN
L= $\sqrt{2}$ DS	0.1068							

4.2.2.7 Incertidumbre

Para iniciar el análisis de incertidumbre del método de determinación de eritrosina (E127) por UPLC-DAD en bebidas, se identificaron de manera sistemática las posibles fuentes que pueden afectar el resultado de concentración reportado. Con este propósito se elaboró un diagrama de causa–efecto (Ishikawa), el cual permite visualizar y organizar los factores que contribuyen a la variabilidad del mensurando a lo largo de todo el proceso analítico. En el diagrama se agrupan las causas potenciales en cinco categorías principales: método, equipos, materiales, condiciones ambientales y operador. Entre los aspectos considerados se incluyen la preparación de la muestra (desgasificación, dilución y filtración), la preparación del estándar y su certificado, la curva de calibración (pendiente e intercepto), el desempeño del sistema cromatográfico (bomba, columna y temperatura), la calibración de material volumétrico (micropipetas, pipetas y matraces), así como componentes asociados a sesgo y precisión intermedia. Este análisis cualitativo constituye la base para seleccionar los componentes relevantes y, posteriormente, construir el presupuesto de incertidumbre del método.

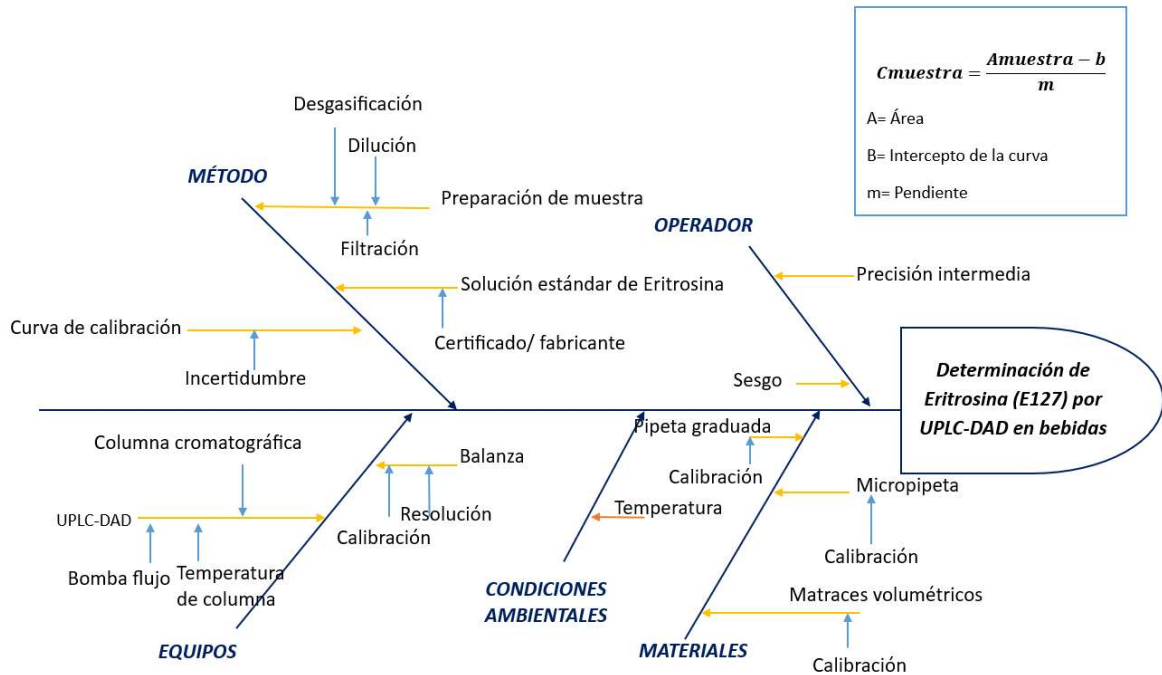


Figura 4.5 diagrama de causa–efecto (Ishikawa)

Tabla 4.15 Componentes de la incertidumbre

Componente	Qué representa	Tipo	Dato	Valor	Unidad	Distribución	Divisor	u_rel (decimal)	u_rel^2
Precisión intermedia (RSD_Pi)	Variación real del método (días/analista)	A	RSD_Pi	2.4186	%	Normal	1	0.0241	0.0005
Calibración (u_rel cal)	Incertidumbre asociada a la curva/ajuste	A	u_rel_cal	1.1275	%	Normal	1	0.0112	0.0001
Sesgo/Recuperación (REC)	Diferencia respecto a 100% de recuperación	B	REC_promedio	95	%	Rectangular	$\sqrt{3}$	0.0288	0.0008
Patrón (CoA)	Inc. del estándar (pureza/valor asignado)	B	U_certificado	1.1	%	Rectangular	1.7321	0.0064	4.1E-05

Tabla 4.16 Resumen de incertidumbre (k = 2)

Componente	Siglas	Valor	Unidad
SCombinada relativa	u rel,c	0.039830927	-
Factor de cobertura	k	2	-
Resultado (concentración reportada)	C	0.096	(µg/mL)
Incertidumbre combinada	uc	0.003823769	(µg/mL)
Incertidumbre expandida	U	0.007647538	(µg/mL)
Incertidumbre expandida relativa	U%	7.966185438	%

Tabla 4.17 Resultados obtenidos

CRITERIO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Selectividad / Especificidad	No se evidenciaron interferencias en blancos/matriz sin fortificar; el pico del analito se observó definido en matrices fortificadas, con RT dentro de tolerancia y criterios espectrales consistentes.
Límite de detección	Hidratante: 0.0193 µg/mL Gaseosa: 0.0117 µg/mL
Límite de cuantificación	Hidratante: 0.0642 µg/mL Gaseosa: 0.0391 µg/mL
Linealidad	Día 1: R ² = 0.9970 Día 2: R ² = 0.9995 Día 3: R ² = 0.9992
Precisión (Repetibilidad)	Hidratante: 1.644–4.128% Gaseosa: 2.543–4.334%
Precisión intermedia	<p>Hidratante</p> <p>%RSDi Bajo: 4.05%</p> <p>%RSDi Medio: 3.98%</p> <p>%RSDi Alto: 2.42%</p> <p>Gaseosa</p> <p>%RSDi Bajo: 7.19%</p> <p>%RSDi Medio: 3.60%</p> <p>%RSDi Alto: 2.92%</p>
Exactitud	Hidratante (rango días 1–3): Bajo 90.868–93.358%; Medio 90.680–98.352%; Alto 98.066–101.940%. Gaseosa (rango días 1–3): Bajo 90.239–101.489%; Medio 97.700–98.036%; Alto 97.830–98.654%.
Robustez	El método mostró sensibilidad principalmente a volumen de inyección, flujo y temperatura (y en gaseosa también a temperatura de autosampler/tiempo de agitación según el caso). Otros factores evaluados se comportaron robustos.
Incertidumbre	U% = 7.97% (k=2)

Al comparar los resultados obtenidos con la literatura, se observa que el desempeño del método se mantiene dentro de rangos habituales para la validación de métodos

cromatográficos aplicados a colorantes sintéticos, especialmente en términos de precisión y recuperación. Como referencia, en un método HPLC-DAD para múltiples colorantes, Palianskikh et al. (2022) reportaron recuperaciones entre 83,7–107,5% y valores de LOQ en el intervalo 0,077–0,262 µg/mL, lo cual permite contextualizar que los niveles de desempeño alcanzados en este estudio son coherentes con reportes previos y con criterios de aceptación comúnmente utilizados.

En ese contexto, que el método cumpla el criterio interno de %RSDi < 8% en ambos tipos de bebida respalda que el desempeño se mantiene estable dentro del laboratorio, aun cuando cambian condiciones habituales como el día de análisis, la corrida o el analista. Estos resultados conviene interpretarlos junto con la robustez, ya que, según la ICH, esta se verifica introduciendo variaciones deliberadas en parámetros del procedimiento para confirmar su confiabilidad; por ello, reconocer qué variables generan mayor impacto resulta útil para definir qué condiciones deben controlarse con mayor rigor en el uso rutinario (ICH, 2023). Asimismo, la incertidumbre de medida se alinea con el enfoque de Eurachem/CITAC, que recomienda aprovechar datos reales (por ejemplo, de validación y control de calidad) y considerar aportes relevantes como los asociados a la recuperación y materiales de referencia (Eurachem/CITAC, 2012).

4.3 Aplicación en bebidas comerciales y verificación regulatoria de E127 en el mercado ecuatoriano

Para dar cumplimiento al tercer objetivo (aplicar el método validado a muestras comerciales), se analizó un total de 12 muestras disponibles en el mercado ecuatoriano: 6 bebidas hidratantes y 6 bebidas gaseosas. Dado que no existe un límite máximo vigente aplicable en el país para eritrosina (E127) en este tipo de bebidas y considerando que, en la práctica, las empresas no deberían incorporar este colorante (aunque exista un plazo de retiro del mercado), el criterio de aceptación adoptado fue la ausencia del analito, es decir, reportar como ND (no detectado) cuando la concentración calculada se encuentre por debajo del límite de detección (LOD) del método.

Tabla 4.18 Muestras de bebidas comerciales

DESCRIPCIÓN	ÁREA	RESULTADO	CONCENTRACIÓN
MUESTRA HIDRA 1	0.9460	-0.0059	ND
MUESTRA HIDRA 2	0.5900	-0.0067	ND
MUESTRA HIDRA 3	0.4040	-0.0071	ND
MUESTRA HIDRA 4	1.8590	-0.0040	ND
MUESTRA GAS 5	0.3100	-0.0073	ND
MUESTRA HIDRA 6	0.6360	-0.0066	ND
MUESTRA GAS 7	0.1770	-0.0076	ND
MUESTRA GAS 8	0.6320	-0.0066	ND
MUESTRA GAS 9	1.8550	-0.0040	ND
MUESTRA GAS 10	1.0950	-0.0056	ND
MUESTRA GAS 11	0.3160	-0.0073	ND
MUESTRA GAS 12	1.3840	-0.0050	ND

La cuantificación se realizó mediante la curva de calibración obtenida (pendiente e intercepto), y la decisión “ND” se estableció comparando la concentración calculada con los LOD determinados para cada matriz: hidratante (LOD = 0.0193 µg/mL; LOQ = 0.0642 µg/mL) y gaseosa (LOD = 0.0117 µg/mL; LOQ = 0.0391 µg/mL). En todas las muestras evaluadas, las áreas registradas generaron concentraciones calculadas inferiores al LOD (incluso con valores negativos producto de la variación alrededor del blanco y del ajuste de la curva), por lo que todas fueron clasificadas como ND. En consecuencia, bajo el criterio establecido para este estudio, los resultados indican que no se evidenció presencia detectable de eritrosina (E127) en las muestras comerciales analizadas.

Respecto a la incertidumbre de medida, esta se aplica formalmente a resultados cuantificables (típicamente a partir del LOQ). En este caso, al encontrarse todas las muestras por debajo del LOD, el reporte apropiado es “< LOD (ND)”, y la incertidumbre no modifica la conclusión de clasificación, ya que no se dispone de una concentración válida para expresar como $C \pm U$ dentro del rango de cuantificación.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se desarrolló y estandarizó un procedimiento cromatográfico por UPLC-DAD/PDA para la identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en matrices de bebidas (hidratantes y gaseosas), estableciendo de forma coherente la preparación de muestras (homogeneización/desgasificación, dilución cuando corresponda y filtración), las condiciones cromatográficas (columna, fase móvil, flujo, temperaturas, volumen de inyección y longitud de onda) y los criterios de identificación (TR y confirmación espectral) y cuantificación mediante curva de calibración en el rango de trabajo definido. Adicionalmente, el procedimiento incorpora controles operativos (QC) y su formato fue estructurado y adaptado conforme al enfoque documental y de aseguramiento de la validez de resultados de la norma ISO/IEC 17025, favoreciendo la trazabilidad y la aplicación rutinaria en el laboratorio.
- El desempeño del método desarrollado fue satisfactorio según los parámetros de validación evaluados. Se evidenció selectividad (sin interferencias relevantes en el tiempo de retención), linealidad en el rango 0,05–2,50 µg/mL (R^2 altos), precisión adecuada en repetibilidad y precisión intermedia dentro de los criterios establecidos, y exactitud conforme en los tres niveles (bajo: 80–120%; medio/alto: 90–110%). Además, se determinaron los LOD/LOQ por matriz (hidratante: 0,0193/0,0642 µg/mL; gaseosa: 0,0117/0,0391 µg/mL) y la incertidumbre expandida relativa fue $U\% = 7,97\%$ ($k=2$), menor al 10%, confirmando la aptitud del método para bebidas hidratantes y gaseosas.
- El método validado se aplicó a 12 muestras comerciales del mercado ecuatoriano (6 bebidas hidratantes y 6 gaseosas). Considerando que no se dispone de límites nacionales vigentes aplicables y que, para este estudio, el criterio adoptado fue la no presencia de eritrosina (E127), todas las muestras fueron reportadas como ND ($< LOD$), al obtenerse concentraciones calculadas por debajo del límite de

detección correspondiente a cada matriz. En consecuencia, bajo las condiciones evaluadas, no se evidenció eritrosina detectable en las bebidas analizadas.

5.2 Recomendaciones

- Para fortalecer la evaluación de la precisión intermedia y la identificación de fuentes de variación, se recomienda que futuros estudios consideren un ANOVA de dos factores (día y analista, o día y matriz), permitiendo estimar de manera más clara la contribución de cada factor y su interacción sobre la variabilidad del método, y así obtener una interpretación más robusta de los errores asociados.
- Ampliar la aplicabilidad del método mediante: (i) validación y vigilancia en matrices con mayor probabilidad de contener eritrosina, como golosinas y confitería, donde históricamente se ha reportado su uso; y (ii) extensión del alcance a otras bebidas, incluyendo bebidas alcohólicas y otras matrices complejas como lácteos o vinos, ajustando la preparación de muestra para controlar efectos de matriz y verificando nuevamente parámetros clave (selectividad, exactitud, LOD/LOQ e incertidumbre).
- Establecer e implementar un plan de control de calidad para la ejecución rutinaria del procedimiento, basado en los resultados de la validación, que incluya controles internos (QC), verificación de calibración, criterios de aceptación por corrida para exactitud/precisión, control de blancos y acciones ante resultados fuera de control, con el fin de asegurar la validez continua de los resultados conforme al enfoque.
- Se recomienda participar de forma planificada en ensayos de aptitud (pruebas externas/proficiency testing) y/o comparaciones interlaboratorio aplicables al análisis de colorantes en alimentos y bebidas, con proveedores reconocidos para el contexto de acreditación en Ecuador. Esta participación constituye la base para demostrar la competencia técnica del método y el desempeño del laboratorio ante terceros, ya que aporta evidencia objetiva del aseguramiento externo de la validez de resultados, complementando la validación interna y fortaleciendo el soporte documental requerido para la acreditación del método bajo ISO/IEC 17025.

6. REFERENCIAS

- . Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria. (2025, January 21). ARCSA ejecuta acción inmediata para regular uso de colorante Rojo No. 3 en productos ecuatorianos. <https://www.controlsanitario.gob.ec/arcsa-ejecuta-accion-inmediata-para-regular-uso-de-colorante-rojo-no-3-en-productos-ecuatorianos/>
- Apostol, L. C., & Gavrilesu, M. (2013). Erythrosine B in the environment. Comparison of removal processes. *Food and Environment Safety*, 12(3), 253–264.
- Chequer, F. M. D., Venâncio, V. de P., Bianchi, M. de L. P., & Antunes, L. M. G. (2012). Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3447–3451. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.042>
- Dey, S., & Nagababu, B. H. (2022). Applications of food color and bio-preservatives in the food and its effect on the human health. *Food Chemistry Advances*, 1, 100019. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100019>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. (2011). Scientific opinion on the re-evaluation of erythrosine (E 127) as a food additive. *EFSA Journal*, 9(1), 1854. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1854>
- Eurachem. (2014). The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics (2nd ed.; B. Magnusson & U. Örnemark, Eds.). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- Eurachem/CITAC. (2012). Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas (3.^a ed.; S. L. R. Ellison & A. Williams, Eds.).

https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_ES.pdf

European Parliament and Council of the European Union. (2008). Reglamento (CE) n.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial de la Unión Europea, L 354, 16–33. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj?locale=es>

Han, Q., Sun, Y., Shen, K., Yan, Y., & Kang, X. (2021). Rapid determination of seven synthetic dyes in casual snacks based on packed-fibers solid-phase extraction coupled with HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 347, 129026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129026>

Hernández Sampieri, R., & Mendoza Torres, C. P. (2018). Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta (1.^a ed.). McGraw-Hill Educación. <https://bibliotecadigital.uce.edu.ec/s/L-D/item/793>

Hiasa, Y., Ohshima, M., Kitahori, Y., Konishi, N., Shimoyama, T., Sakaguchi, Y., Hashimoto, H., Minami, S., & Kato, Y. (1988). The promoting effects of food dyes, erythrosine (Red 3) and rose bengal B (Red 105), on thyroid tumors in partially thyroidectomized N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-treated rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 79(3), 314–319. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1988.tb01593.x>

Ibáñez, F. C., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. Universidad Pública de Navarra. <https://cegecep.com/wp-content/uploads/2017/02/Aditivos-alimentarios-2003.pdf>

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2023). ICH Q2(R2): Validation of analytical procedures. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (1993). Erythrosine. In *Compendium of food additive specifications. Addendum 2 (FAO Food and*

Nutrition Paper No. 52 Add. 2). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Luzardo, I., Ramírez, Á., Yáñez, J., Mojica, L., & Luna, D. (2021). Technological applications of natural colorants in food systems: A review. *Foods*, 10(3), 634. <https://doi.org/10.3390/foods10030634>

Ma, K., Zhang, Y., & Wu, T. (2025). Accurate determination of 24 water-soluble synthetic colorants in premade cocktail using ultra-performance liquid chromatography with diode array detection. *Beverages*, 11, 91. <https://doi.org/10.3390/beverages11030091>

Miller, M. D., Steinmaus, C., Golub, M. S., Castorina, R., Thilakaratne, R., Bradman, A., & Marty, M. A. (2022). Potential impacts of synthetic food dyes on activity and attention in children: A review of the human and animal evidence. *Environmental Health*, 21(45), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00839-9>

National Center for Biotechnology Information. (n.d.). PubChem compound summary for erythrosine (CID 61357). Retrieved December 3, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erythrosine>

Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Natural food colorants and preservatives: A review, a demand, and a challenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 2789–2805. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07533>

Ntrallou, K., Gika, H., & Tsochatzis, E. (2020). Analytical and sample preparation techniques for the determination of food colorants in food matrices. *Foods*, 9(1), Article 58. <https://doi.org/10.3390/foods9010058>

Palianskikh, A. I., Sychik, S. I., Leschev, S. M., Pliashak, Y. M., Fiodarava, T. A., & Belyshava, L. L. (2022). Development and validation of the HPLC-DAD method for the quantification of 16 synthetic dyes in various foods and the use of liquid anion exchange extraction for qualitative expression determination. *Food Chemistry*, 369, 130947. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130947>

- Pino, M. T., Vergara, C., Rossier, F., Zamora, O., Sandoval, A. M., Almajano, M. P., García, D., Astudillo, C., Quintanilla, M., Kerh, E., Inostroza, L., Kalazich, J., Uribe, M., Muñoz, D., Álvarez, F., Jesús, M., Leal, C., Domínguez, E., Águila, K., & Pérez, R. (2020). *Colorantes y antioxidantes naturales*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Chile.
- Sánchez Juan, R. (2013). La química del color en los alimentos. *Química Viva*, 12(3), 234–246. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278005>
- Singh, M., & Chadha, P. (2024). Assessment of synthetic food dye erythrosine induced cytotoxicity, genotoxicity, biochemical and molecular alterations in *Allium cepa* root meristematic cells: Insights from in silico study. *Toxicology Research*, 13(4), tfae126. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfae126>
- Snigur, D., Fizer, M., Chebotarev, A., Lukianova, O., & Zhukovetska, O. (2022). Spectroscopic and computational studies of erythrosine food dye protonation in aqueous solution. *Dyes and Pigments*, 198, 110028. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110028>
- Tsai, C.-F., Kuo, C.-H., & Shih, D. Y.-C. (2015). Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.09.003>
- U.S. Food and Drug Administration. (2017, November 3). Color additives history. <https://www.fda.gov/industry/color-additives/color-additives-history>
- U.S. Food and Drug Administration. (2023, July 6). Color additives in foods. <https://www.fda.gov/food/color-additives-information-consumers/color-additives-foods>
- U.S. Food and Drug Administration. (2025, January 15). FDA to revoke authorization for the use of Red No. 3 in food and ingested drugs. <https://www.fda.gov/food/hfp-constituent-updates/fda-revoke-authorization-use-red-no-3-food-and-ingested-drugs>

- Xie, S. (2022). Rapid determination of erythrosine in beverages by UPLC. *Food and Machinery*, 38(4), 85–88.
<https://doi.org/10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90101>
- Yang, Y., Zhang, J., & Shao, B. (2014). Quantitative analysis of fourteen synthetic dyes in jelly and gummy candy by ultra performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 6, 5872–5878.
<https://doi.org/10.1039/C4AY00371C>

7. APENDICES Y ANEXOS

APÉNDICE A: PROCEDIMIENTO DE OBJETIVO 1

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 1 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ERITROSINA (E127) EN BEBIDAS POR UPLC-DAD

	Fecha	Nombre	Firma
Realizado	dd-mmm-aaaa	<i>Nombre Apellido</i>	_____
Revisado	dd-mmm-aaaa	<i>Nombre Apellido</i>	_____
Aprobado	dd-mmm-aaaa	<i>Nombre Apellido</i>	_____

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.1 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 2 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ALCANCE
3. DEFINICIONES
4. RESPONSABILIDADES
5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS
6. PROCEDIMIENTO
7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS
8. CONTROL DE CALIDAD INTERNO
9. CONTROL DE CAMBIOS

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.2 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 3 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

1. OBJETIVO

Establecer la metodología a seguir por el laboratorio LAB-TESIS para la identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas hidratantes y gaseosas mediante cromatografía líquida UPLC con detector DAD/PDA, bajo las condiciones cromatográficas definidas en este procedimiento.

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica al análisis de eritrosina (E127) en matrices de bebidas hidratantes y gaseosas que ingresen al laboratorio LAB-TESIS para su ensayo por UPLC-DAD/PDA.

Rango de trabajo: 0.05 a 2.50 µg/mL (según curva de calibración del método).

3. DEFINICIONES

Eritrosina (E127): Analito objetivo de este procedimiento.

UPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia usada para separar compuestos antes de su detección.

Fase móvil: Mezcla de solventes que transporta los compuestos a través de la columna.

Solución madre: Solución concentrada a partir del estándar, usada para preparar diluciones.

Solución intermedia: Dilución previa que facilita preparar los niveles de la curva.

Solución estándar (patrón): Solución de concentración conocida usada para construir la curva.

Curva de calibración: Relación entre respuesta del detector (área/altura) y concentración de los estándares.

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.3 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 4 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

Factor de dilución (FD): Número que representa cuánto se diluyó una muestra antes del análisis.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente Técnico:

- ✓ Revisar y aprobar la implementación del procedimiento.

Coordinador de laboratorio:

- ✓ Supervisar la correcta aplicación del procedimiento en el laboratorio.
- ✓ Coordinar con los analistas la ejecución del monitoreo interno.
- ✓ Asegurar la calibración y mantenimiento de los equipos utilizados.
- ✓ Asegurar el cumplimiento de los controles internos de calidad.
- ✓ Revisar los registros de ensayos y reportar anomalías.
- ✓ Implementar acciones correctivas en caso de desviaciones en los resultados.

Coordinador de calidad:

- ✓ Realizar auditorías internas sobre la validez de los resultados.
- ✓ Supervisar el control de calidad de reactivos, insumos y equipos.
- ✓ Analizar tendencias en los resultados de los ensayos.
- ✓ Reportar hallazgos y proponer mejoras al Gerente Técnico.
- ✓ Mantener los registros de calidad y documentación del procedimiento.

Analistas de laboratorio:

- ✓ Ejecutar los ensayos siguiendo los procedimientos establecidos.
- ✓ Registrar los datos de los ensayos en los formatos correspondientes.
- ✓ Aplicar controles internos de calidad en cada análisis.
- ✓ Notificar al coordinador de laboratorio cualquier anomalía en los resultados.

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.4 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 5 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

- ✓ Verificar el estado de los reactivos, insumos y equipos antes de cada análisis.
- ✓ Participar en capacitaciones sobre aseguramiento de calidad.
- ✓ Apoyar en la implementación de mejoras en el laboratorio.

5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

5.1 Equipos

- Sistema UPLC con detector DAD/PDA (análisis)
- Columna BEH, 100 × 2.1 mm, 1.7 µm (separación)
- Baño ultrasónico (sonicación/desgasificación)
- Balanza analítica (si pesas para preparar solución madre desde sólido)
- Micropipetas automáticas (10–100 µL, 100–1000 µL)
- Sistema de purificación de agua tipo Milli-Q

5.2 Materiales

- Matraces aforados 10 mL y 25 mL
- Vidrio reloj
- Espátula
- Piseta
- Jeringas desechables para filtración
- Filtros de jeringa nylon 0,45 µm
- Viales ámbar para UPLC con tapas/septa
- Frascos/botellas para fase móvil (A/B)
- Puntas para micropipeta

5.3 Reactivos

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.5 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 6 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

- Metanol grado UPLC (fase móvil)
- Acetonitrilo grado UPLC (fase móvil)
- Acetato de amonio (preparación de 10 mM)
- Agua ultrapura (tipo Milli-Q) (diluciones y fase móvil)
- Eritrosina (E127) estándar primario (asignación/confirmación de concentración)
- Eritrosina (E127) estándar secundario (preparación de soluciones de trabajo y curva)

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Principio del método

La eritrosina se separa por cromatografía líquida en fase reversa (columna C18) bajo elución isocrática. La identificación se sustenta en la coincidencia del TR con el estándar y en la comparación del espectro UV-Vis obtenido por DAD/PDA. La cuantificación se realiza mediante una curva de calibración (respuesta vs concentración).

6.2 Preparación de soluciones estándar (curva 0.05–2.50 µg/mL)

- a) Verificar y registrar la información del estándar de eritrosina (lote, pureza/valor asignado, fecha de apertura y condiciones de conservación).
- b) Asignar la concentración de trabajo del estándar (según certificado o valor asignado por el laboratorio) y registrar el cálculo correspondiente.
- c) Preparar una solución madre de eritrosina de 1000 µg/mL en agua ultrapura.
- d) Preparar una solución intermedia de 25 µg/mL en matraz aforado de 25 mL, a partir de la solución madre, de acuerdo con los volúmenes establecidos en la Tabla de preparación de curva de calibración.

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.6 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 7 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

- e) Preparar las soluciones estándar de calibración (0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.50 µg/mL) en matraces aforados de 10 mL, utilizando la solución intermedia (25 µg/mL) y completando con agua ultrapura. Homogeneizar y transferir a viales ámbar debidamente identificados (concentración, fecha, analista). Conservar protegidos de la luz hasta el análisis.

Solución intermedia (25 ug/ml)			Estándar objetivo	Solución estándar		
V aforo (ml)	Volumen solución intermedia (ul)	Volumen agua ultrapura (ml)	Concentración (ug/ml)	V aforo (ml)	Solución madre volumen (ul)	V agua ultrapura (ml)
			0.05	10	20	9.98
			0.1	10	40	9.96
			0.25	10	100	9.90
			0.5	10	200	9.80
			1	10	400	9.60
			2.5	10	1000	9.00
25	250	24.75				

6.3 Preparación de muestras (bebidas hidratantes y gaseosas)

- Recepción e identificación:** Verificar integridad del envase y registrar la muestra (código interno, cliente, matriz, fecha/hora de recepción). Etiquetar el recipiente de trabajo y el vial final con el código de muestra.
- Atemperado y homogeneización:** Llevar la muestra a temperatura ambiente (si aplica) y homogeneizar mediante inversión/agitación suave, evitando formación excesiva de espuma.
- Desgasificación**
Desgasificar mediante agitación suave 1 minuto y colocar en baño ultrasónico 15 minutos para reducir gas disuelto.

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.7 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 8 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

- d) **Preparación para inyección:** Tomar un volumen representativo de muestra. Si la respuesta esperada pudiera exceder el rango de trabajo, realizar dilución con agua ultrapura) y registrar el factor de dilución (FD).
- e) **Filtración:** Filtrar la muestra mediante filtro de jeringa nylon 0.45 µm.
- f) **Vial y conservación:** Transferir el filtrado a vial ámbar y cerrar correctamente. Conservar protegido de la luz y bajo condiciones adecuadas hasta el análisis.
- g) **Registro:** Registrar en la hoja de trabajo cualquier observación relevante (presencia de gas, turbidez, precipitado, necesidad de dilución, anomalías en el filtrado).

7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Columna: BEH C18, 100 × 2.1 mm, 1.7 µm.
- Fase móvil (isocrática): acetato de amonio 10 mM: Metanol: Acetonitrilo (50:25:25 v/v/v), filtrada y desgasificada.
- Flujo: 0.40 mL/min.
- Temperatura de columna: 30 °C.
- Temperatura de autosampler: 20 °C.
- Detector: DAD/PDA.
- Longitud de onda: 529 nm; barrido 200–600 nm para verificación espectral.
- Volumen de inyección: 20 µL.
- Modo de elución: isocrático.

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.8 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

LOGO	Procedimiento para identificación y cuantificación de eritrosina (E127) en bebidas por UPLC-DAD	Código: TESIS-PROG-01 Versión: 01 Fecha de emisión: dd-mmm-aaaa Próxima revisión: dd-mmm-aaaa Página 9 de 9
<i>Cláusula 7.2 de Norma ISO/IEC 17025:2017</i>		

8. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

En la determinación de eritrosina (E127) en bebidas hidratantes y gaseosas mediante UPLC-DAD/PDA, se implementa un control interno de calidad basado en la inyección periódica de un control de calidad (QC) dentro de la secuencia analítica. Esto significa que, por cada 10 muestras de rutina analizadas, se inyectará al menos un QC preparado a una concentración conocida de 1,00 µg/mL de eritrosina.

El estándar de verificación se considerará conforme cuando el valor calculado se encuentre entre 0,90 y 1,10 µg/mL ($\pm 10\%$). Esta medida permite verificar que el método se mantiene bajo control durante el análisis rutinario, asegurando la confiabilidad de los resultados reportados; en caso de incumplimiento del criterio, se evaluará la secuencia desde el último QC conforme y se aplicarán las acciones definidas por el laboratorio antes de liberar resultados.

9. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de modificación	Sección modificada	Descripción del cambio	Motivo del cambio	Responsable del cambio	Versión actualizada
dd-mm-aaaa	Creación del documento	N/A	N/A	Coordinador de calidad	01

Documento controlado: Este documento es de uso exclusivo del laboratorio. No está permitida su reproducción, distribución o modificación sin autorización expresa de la administración del sistema de gestión.

Fig A.9 Procedimiento para identificación y cuantificación de Eritrosina

APÉNDICE B: LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Matriz hidratante fortificada (0.096 µg/mL)				Matriz gaseosa fortificada (0.096 µg/mL)			
ÁREA		CONCENTRACIÓN		ÁREA		CONCENTRACIÓN	
44.4990	0.0884			41.3400	0.0820		
43.8730	0.0871			42.0680	0.0835		
43.9170	0.0872			42.5840	0.0845		
45.5770	0.0906			41.6270	0.0826		
48.2870	0.0961			44.7430	0.0889		
41.3440	0.0820			44.4170	0.0882		
52.4540	0.1045			47.3090	0.0941		
43.9130	0.0872			42.0680	0.0835		
44.4970	0.0884			41.6270	0.0826		
48.2770	0.0961			44.4170	0.0882		
S_y	3.1715	S_o	0.0064	S_y	1.9314	S_o	0.0039
LOD	0.0193	LOD	0.0193	LOD	0.0117	LOD	0.0117
LOQ	0.0642	LOQ	0.0643	LOQ	0.0391	LOQ	0.0391

Fig B.1 Datos para la estimación de LOD y LOQ

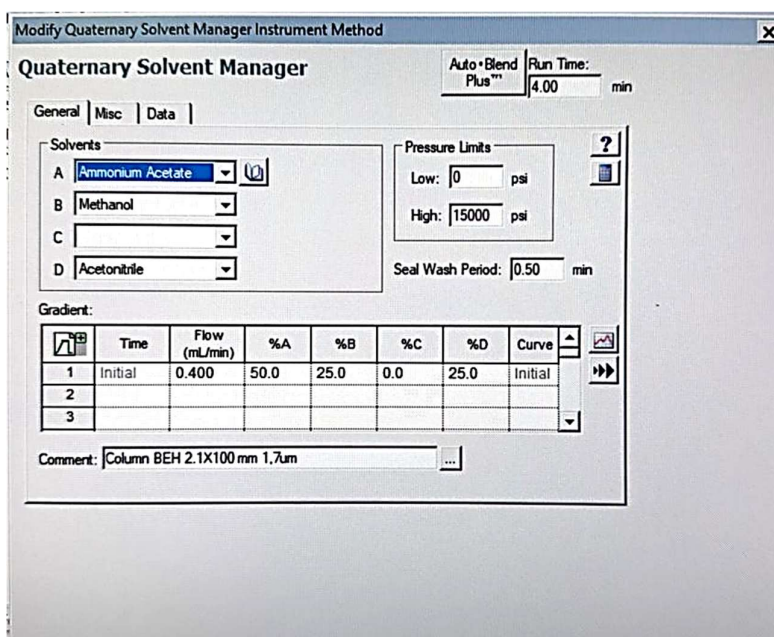


Fig B.2 Condiciones iniciales

APÉNDICE C: LINEALIDAD

N° Análisis	N° Réplica	Concentración teórica (µg/mL)	Área	Concentración calculada (µg/mL)
1	R1	0.0500	26.2410	0.0514
2	R2	0.0500	26.1680	0.0513
3	R3	0.0500	23.8800	0.0466
4	R1	0.1000	94.9210	0.1906
5	R2	0.1000	91.3750	0.1834
6	R3	0.1000	87.6660	0.1759
7	R1	0.2500	119.2340	0.2398
8	R2	0.2500	119.9400	0.2413
9	R3	0.2500	114.7840	0.2308
10	R1	0.5000	228.8880	0.4620
11	R2	0.5000	221.8030	0.4476
12	R3	0.5000	232.2960	0.4689
13	R1	1.0000	462.9180	0.9361
14	R2	1.0000	465.4350	0.9412
15	R3	1.0000	466.3990	0.9432
16	R1	2.5000	1254.4630	2.5398
17	R2	2.5000	1256.5290	2.5440
18	R3	2.5000	1237.8440	2.5061

Fig C.1 Datos experimentales de la curva de calibración día 1

Concentración teórica (µg/mL)	Área	Concentración calculada (µg/mL)
0.0500	25.4297	0.0498
0.1000	91.3207	0.1833
0.2500	117.9860	0.2373
0.5000	227.6623	0.4595
1.0000	464.9173	0.9402
2.5000	1249.6120	2.5300

Fig C.2 Promedios por nivel de calibración (Curva Día 1)

Curva de calibración Día 1

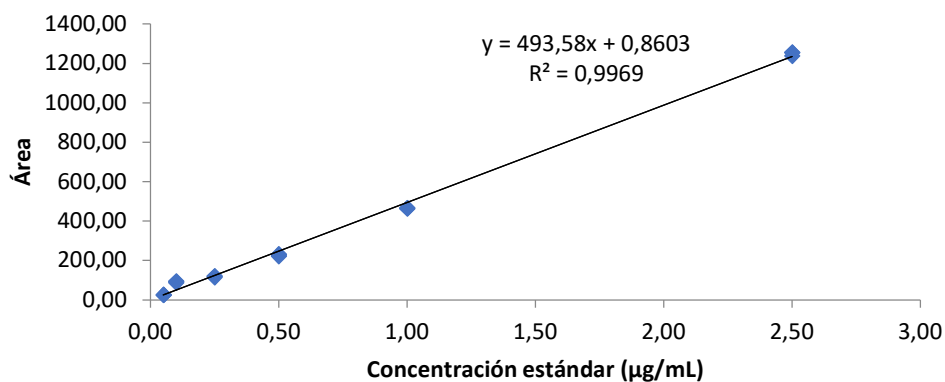


Fig C.3 Curva de calibración día 1

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.998434186
Coeficiente de determinación R ²	0.996870825
R ² ajustado	0.996675251
Error típico	24.96996898
Observaciones	18
R² ≥ 0.995	

Fig C.4 Estadísticas de regresión día 1

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3178081.17	3178081.167	5097.168366	1.80777E-21
Residuos	16	9975.98961	623.4993507		
Total	17	3188057.16			

Fig C.5 Análisis de varianza día 1

H0: Las variables X y Y no están relacionadas entre sí

Ha: Las variables X y Y si están relacionadas entre sí

Se rechaza la H0 y se acepta la Ha porque **Fcal > Fcrítico**

El valor p $1.80E-21 < 0.05$ la pendiente; por tanto, es **estadísticamente diferente de 0**

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<i>Intercepción</i>	0.8603	7.7680	0.1107	0.9132	-15.6073	17.3278
<i>Concentración teórica (µg/mL)</i>	493.5833	6.9135	71.3945	0.0000	478.9274	508.2392

Fig C.6 Coeficientes e intervalo de confianza regresión día 1

El intervalo de confianza al 95% para el intercepto fue de -15.607 a 17.328, incluyendo el valor 0 dentro del rango.

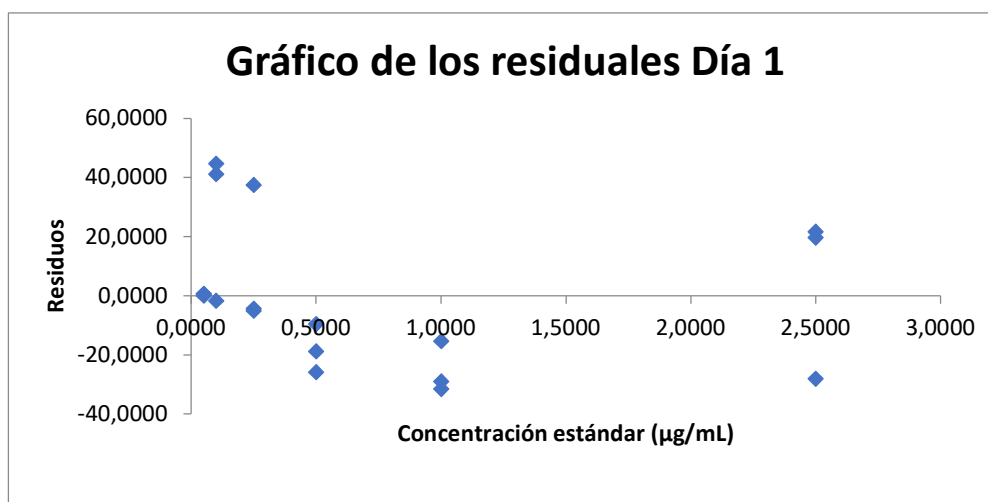


Fig C.7 Gráfico de residuales día 1

Observación	Pronóstico Área	Residuos	Residuos estándares
1	25.5394	0.7016	0.0290
2	25.5394	0.6286	0.0259
3	25.5394	-1.6594	-0.0685
4	50.2186	44.7024	1.8453
5	50.2186	41.1564	1.6990
6	50.2186	37.4474	1.5459
7	124.2561	-5.0221	-0.2073
8	124.2561	-4.3161	-0.1782
9	124.2561	-9.4721	-0.3910
10	247.6519	-18.7639	-0.7746
11	247.6519	-25.8489	-1.0671
12	247.6519	-15.3559	-0.6339
13	494.4435	-31.5255	-1.3014
14	494.4435	-29.0085	-1.1975
15	494.4435	-28.0445	-1.1577
16	1234.8185	19.6445	0.8109
17	1234.8185	21.7105	0.8962
18	1234.8185	3.0255	0.1249

Fig C.8 Análisis de residuales día 1

Los residuos se distribuyen alrededor de cero sin evidencia de una tendencia sistemática con la concentración. Los residuos estandarizados se mantienen dentro de límites aceptables (± 2), lo que sugiere ausencia de valores atípicos y un ajuste lineal adecuado. La dispersión de los residuos es comparable a lo largo del rango evaluado, lo cual es consistente con el supuesto de homocedasticidad.

N° Análisis	N° Réplica	Concentración teórica (µg/mL)	Área	Concentración calculada (µg/mL)
1	R1	0.0500	24.5900	0.0683
2	R2	0.0500	25.7240	0.0705
3	R3	0.0500	24.1750	0.0674
4	R1	0.1000	40.9860	0.1010
5	R2	0.1000	52.1370	0.1232
6	R3	0.1000	43.2060	0.1054
7	R1	0.2500	116.5670	0.2516
8	R2	0.2500	119.0280	0.2565
9	R3	0.2500	108.4040	0.2354
10	R1	0.5000	236.1450	0.4900
11	R2	0.5000	228.9300	0.4756
12	R3	0.5000	251.6000	0.5208
13	R1	1.0000	474.2110	0.9646
14	R2	1.0000	471.4680	0.9591
15	R3	1.0000	474.4130	0.9650
16	R1	2.5000	1253.0460	2.5172
17	R2	2.5000	1256.3850	2.5239
18	R3	2.5000	1246.6760	2.5045

Fig C.9 Datos experimentales de la curva de calibración día 2

Concentración teórica (µg/mL)	Área	Concentración calculada (µg/mL)
0.0500	24.8297	0.0687
0.1000	45.4430	0.1098
0.2500	114.6663	0.2478
0.5000	238.8917	0.4955
1.0000	473.3640	0.9629
2.5000	1252.0357	2.5152

Fig C.10 Promedios por nivel de calibración (Curva Día 2)

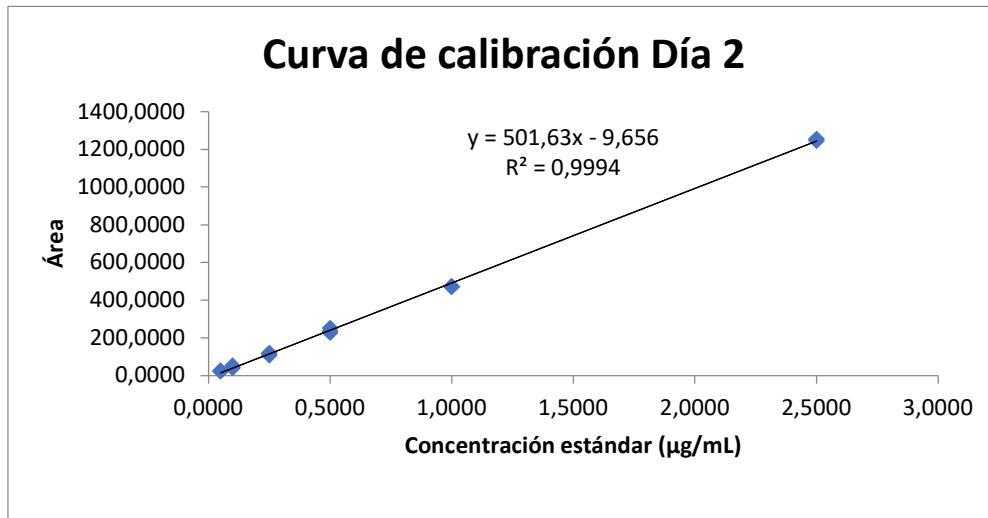


Fig C.11 Curva de calibración día 2

Estadísticas de la regresión	
<i>Coeficiente de correlación múltiple</i>	0.9997
<i>Coeficiente de determinación R²</i>	0.9994
<i>R² ajustado</i>	0.9993
<i>Error típico</i>	11.2516
<i>Observaciones</i>	18

R² ≥ 0.995

Fig C.12 Estadísticas de regresión día 2

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<i>Regresión</i>	1	3282531.9738	3282531.9738	25928.6997	0.0000
<i>Residuos</i>	16	2025.5744	126.5984		
<i>Total</i>	17	3284557.5483			

Fig C.13 Análisis de varianza día 2

H₀: Las variables X y Y no están relacionadas entre sí

H_a: Las variables X y Y si están relacionadas entre sí

Se rechaza la H₀ y se acepta la H_a porque **F_{cal} > F_{crítico}**

El valor p 4.11E-21 < 0.05 la pendiente; por tanto, es **estadísticamente diferente de 0**

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<i>Intercepción</i>	-9.6560	3.5003	-2.7586	0.0140	-17.0764	-2.2357
<i>Concentración teórica (µg/mL)</i>	501.6288	3.1152	161.0239	0.0000	495.0248	508.2328

El intervalo de confianza al 95% para el intercepto fue de -17.076 a -2.236, no incluye **el valor 0 dentro del rango.**

Fig C.14 Coeficientes e intervalo de confianza regresión día 2

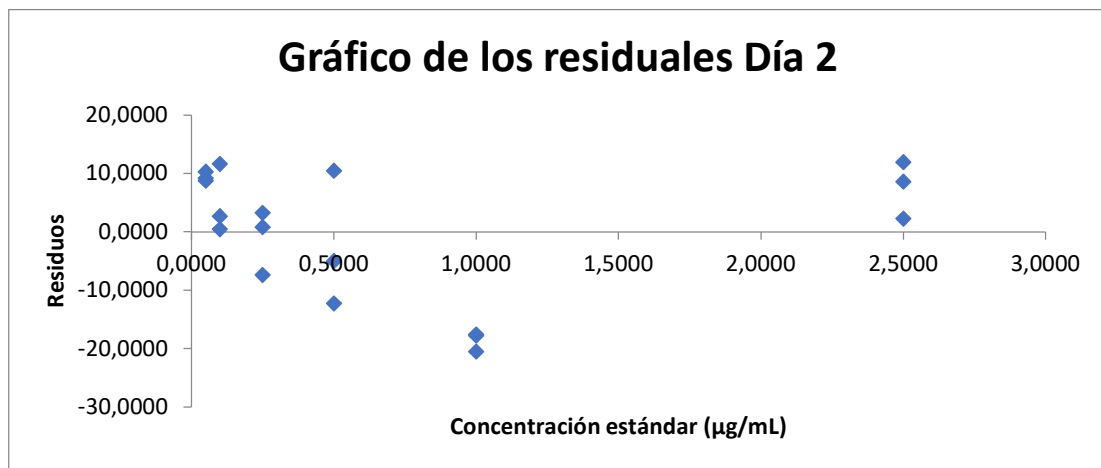


Fig C.15 Gráfico de residuales día 2

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico Área</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
1	15.4254	9.1646	0.8396
2	15.4254	10.2986	0.9435
3	15.4254	8.7496	0.8016
4	40.5068	0.4792	0.0439
5	40.5068	11.6302	1.0655
6	40.5068	2.6992	0.2473
7	115.7511	0.8159	0.0747
8	115.7511	3.2769	0.3002
9	115.7511	-7.3471	-0.6731
10	241.1583	-5.0133	-0.4593
11	241.1583	-12.2283	-1.1203
12	241.1583	10.4417	0.9566
13	491.9727	-17.7617	-1.6272
14	491.9727	-20.5047	-1.8785
15	491.9727	-17.5597	-1.6087
16	1244.4159	8.6301	0.7906
17	1244.4159	11.9691	1.0965
18	1244.4159	2.2601	0.2071

Fig C.16 Análisis de residuales día 2

Los residuos oscilan alrededor de cero sin evidencia de una tendencia sistemática con la concentración. Los residuos estandarizados se mantienen dentro de límites aceptables (± 2), alcanzando aproximadamente valores entre -1.88 y $+1.10$, lo que sugiere ausencia de valores atípicos y un ajuste lineal adecuado. La dispersión de los residuos es comparable a lo largo del rango evaluado, lo cual es compatible con el supuesto de homocedasticidad.

N° Análisis	N° Réplica	Concentración teórica (µg/mL)	Área	Concentración calculada (µg/mL)
1	R1	0.0500	43.1000	0.0862
2	R2	0.0500	26.9210	0.0524
3	R3	0.0500	36.0980	0.0716
4	R1	0.1000	47.5300	0.0954
5	R2	0.1000	58.6140	0.1186
6	R3	0.1000	60.3790	0.1223
7	R1	0.2500	130.6210	0.2688
8	R2	0.2500	128.1030	0.2636
9	R3	0.2500	126.0270	0.2593
10	R1	0.5000	229.4080	0.4750
11	R2	0.5000	232.3960	0.4812
12	R3	0.5000	225.9670	0.4678
13	R1	1.0000	461.2840	0.9589
14	R2	1.0000	464.9840	0.9666
15	R3	1.0000	460.2630	0.9568
16	R1	2.5000	1206.6030	2.5143
17	R2	2.5000	1209.8860	2.5212
18	R3	2.5000	1209.3300	2.5200

Fig C.17 Datos experimentales de la curva de calibración día 3

Concentración teórica (µg/mL)	Área	Concentración calculada (µg/mL)
0.0500	35.3730	0.0701
0.1000	55.5077	0.1121
0.2500	128.2503	0.2639
0.5000	229.2570	0.4747
1.0000	462.1770	0.9608
2.5000	1208.6063	2.5185

Fig C.18 Promedios por nivel de calibración (Curva Día 3)

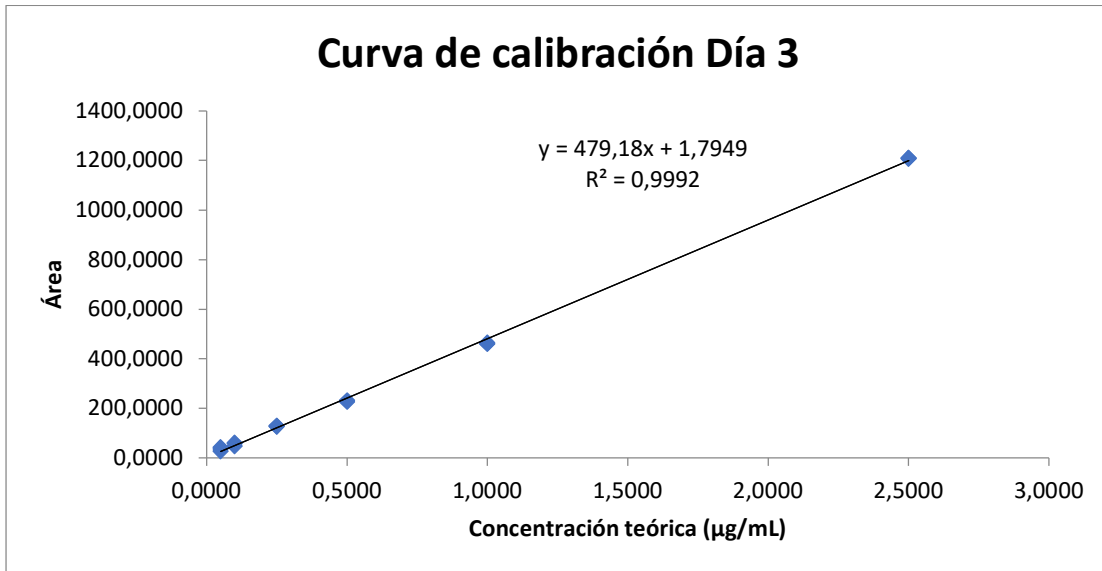


Fig C.19 Curva de calibración día 3

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9996
Coefficiente de determinación R ²	0.9992
R ² ajustado	0.9991
Error típico	12.5668
Observaciones	18.0000
R² ≥ 0.995	

Fig C.20 Estadísticas de regresión día 3

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1.0000	2995336.4664	2995336.4664	18966.7545	0.0000
Residuos	16.0000	2526.8099	157.9256		
Total	17.0000	2997863.2763			

Fig C.21 Análisis de varianza día 3

H0: Las variables X y Y no están relacionadas entre sí

Ha: Las variables X y Y si están relacionadas entre sí

Se rechaza la H0 y se acepta la Ha porque $F_{cal} > F_{crítico}$

El valor p $5.00E-26 < 0.05$ la pendiente; por tanto, es **estadísticamente diferente de 0**

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1.7949	3.9095	0.4591	0.6523	-6.4929	10.0826
Concentración teórica (µg/mL)	479.1823	3.4794	137.7198	0.0000	471.8063	486.5583

Fig C.22 Coeficientes e intervalo de confianza regresión día 3

El intervalo de confianza al 95% para el intercepto fue de -6.493 a 10.083, **incluyendo el valor 0 dentro del rango.**

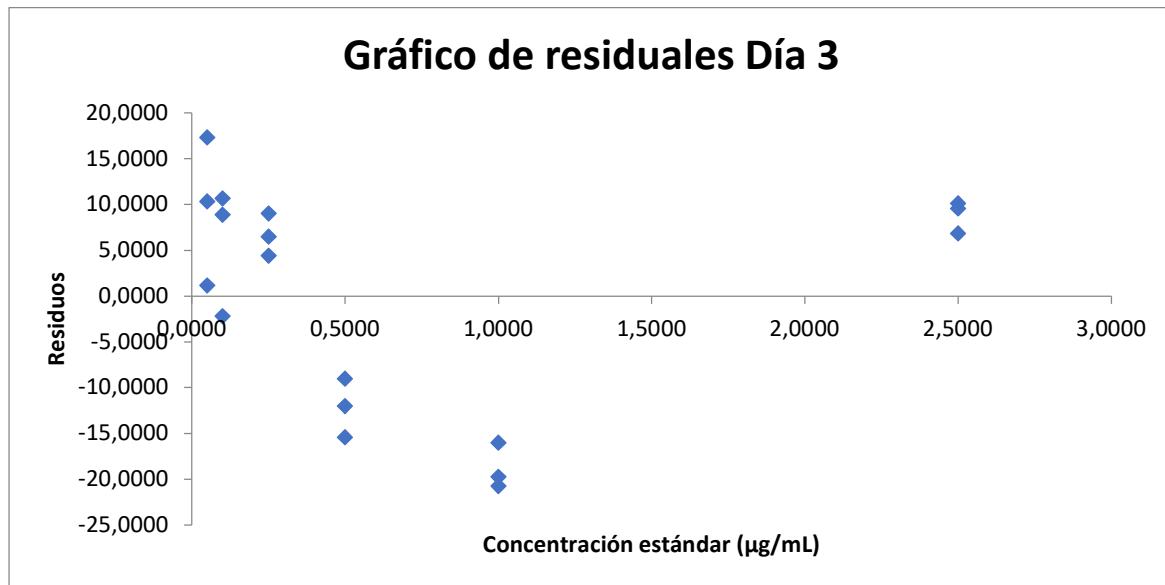


Fig C.23 Gráfico de residuales día 3

Observación	Pronóstico Área	Residuos	Residuos estándares
1	25.7540	17.3460	1.4228
2	25.7540	1.1670	0.0957
3	25.7540	10.3440	0.8485
4	49.7131	-2.1831	-0.1791
5	49.7131	8.9009	0.7301
6	49.7131	10.6659	0.8749
7	121.5904	9.0306	0.7407
8	121.5904	6.5126	0.5342
9	121.5904	4.4366	0.3639
10	241.3860	-11.9780	-0.9825
11	241.3860	-8.9900	-0.7374
12	241.3860	-15.4190	-1.2647
13	480.9772	-19.6932	-1.6153
14	480.9772	-15.9932	-1.3118
15	480.9772	-20.7142	-1.6990
16	1199.7506	6.8524	0.5621
17	1199.7506	10.1354	0.8313
18	1199.7506	9.5794	0.7857

Fig C.24 Análisis de residuales día 3

Los residuos oscilan alrededor de cero sin evidencia de una tendencia sistemática con la concentración. Los residuos estandarizados se mantienen dentro de límites aceptables (± 2), alcanzando aproximadamente valores entre $-1,70$ y $+1,42$, lo que sugiere ausencia de valores atípicos y un ajuste lineal adecuado. La dispersión de los residuos es comparable a lo largo del rango evaluado, lo cual es compatible con el supuesto de homocedasticidad.

APÉNDICE D: PRECISIÓN REPETIBILIDAD

MATRIZ	CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)	NIVEL	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	CÁLCULOS	
HIDRATANTE	0.0960	BAJO	1	0.0884	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0871		
			3	0.0872	\bar{x}	0.0894
			4	0.0906	SD	0.0035
			5	0.0961	%RSD	3.9562
			6	0.0870	CRITERIO	%RSD _r ≤ 5%
			QC	0.1045	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.0960	BAJO	1	0.0920	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0835		
			3	0.0845	\bar{x}	0.0866
			4	0.0826	SD	0.0037
			5	0.0889	%RSD	4.2361
			6	0.0882	CRITERIO	%RSD _r ≤ 5%
			QC	0.0941	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	0.4960	MEDIO	1	0.4574	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.5021		
			3	0.4878	\bar{x}	0.4905
			4	0.4828	SD	0.0194
			5	0.5132	%RSD	3.9607
			6	0.4994	CRITERIO	%RSD _r ≤ 5%
			QC	0.5050	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.4960	MEDIO	1	0.4709	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.5025		
			3	0.4718	\bar{x}	0.4863
			4	0.4982	SD	0.0133
			5	0.4910	%RSD	2.7308
			6	0.4831	CRITERIO	%RSD _r ≤ 5%
			QC	0.4902	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	2.4960	ALTO	1	2.4688	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4503		
			3	2.5153	\bar{x}	2.5032
			4	2.4558	SD	0.0772
			5	2.6538	%RSD	3.0859
			6	2.4751	CRITERIO	%RSD _r ≤ 5%
			QC	2.5777	CUMPLE	SI
GASEOSA	2.4960	ALTO	1	2.3448	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4531		
			3	2.3637	\bar{x}	2.4418
			4	2.4583	SD	0.0757
			5	2.4852	%RSD	3.1004
			6	2.5460	CRITERIO	%RSD _r ≤ 5%
			QC	2.4592	CUMPLE	SI

Fig D.1 Repetibilidad día 1

MATRIZ	CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)	NIVEL	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	CÁLCULOS
HIDRATANTE	0.0960	BAJO	1.0000	0.0846	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6) \bar{x} 0.0903 SD 0.0037 %RSD 4.1279 CRITERIO %RSD _r ≤ 5% CUMPLE SI
			2.0000	0.0874	
			3.0000	0.0896	
			4.0000	0.0941	
			5.0000	0.0926	
			6.0000	0.0933	
			QC	0.1048	
GASEOSA	0.0960	BAJO	1.0000	0.0954	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6) \bar{x} 0.0974 SD 0.0036 %RSD 3.6728 CRITERIO %RSD _r ≤ 5% CUMPLE SI
			2.0000	0.0999	
			3.0000	0.0962	
			4.0000	0.0936	
			5.0000	0.1034	
			6.0000	0.0961	
			QC	0.0963	
HIDRATANTE	0.4960	MEDIO	1.0000	0.4890	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6) \bar{x} 0.4702 SD 0.0144 %RSD 3.0644 CRITERIO %RSD _r ≤ 5% CUMPLE SI
			2.0000	0.4772	
			3.0000	0.4630	
			4.0000	0.4756	
			5.0000	0.4696	
			6.0000	0.4467	
			QC	0.4975	
GASEOSA	0.4960	MEDIO	1.0000	0.4710	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6) \bar{x} 0.4861 SD 0.0174 %RSD 3.5811 CRITERIO %RSD _r ≤ 5% CUMPLE SI
			2.0000	0.5100	
			3.0000	0.4628	
			4.0000	0.4980	
			5.0000	0.4912	
			6.0000	0.4833	
			QC	0.4902	
HIDRATANTE	2.4960	ALTO	1.0000	2.4352	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6) \bar{x} 2.4909 SD 0.0409 %RSD 1.6437 CRITERIO %RSD _r ≤ 5% CUMPLE SI
			2.0000	2.4984	
			3.0000	2.5444	
			4.0000	2.4646	
			5.0000	2.4747	
			6.0000	2.5284	
			QC	2.3350	
GASEOSA	2.4960	ALTO	1.0000	2.4800	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6) \bar{x} 2.4624 SD 0.0626 %RSD 2.5426 CRITERIO %RSD _r ≤ 5% CUMPLE SI
			2.0000	2.5173	
			3.0000	2.4524	
			4.0000	2.4322	
			5.0000	2.5321	
			6.0000	2.3604	
			QC	2.5383	

Fig D.2 Repetibilidad día 2

MATRIZ	CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)	NIVEL	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	CÁLCULOS	
HIDRATANTE	0.0960	BAJO	1.	0.0963	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2.	0.0890		
			3.	0.0886	\bar{x}	0.0909
			4.	0.0883	SD	0.0030
			5.	0.0912	%RSD	3.3434
			6.	0.0919	CRITERIO %RSD _r ≤ 5%	
			QC	0.0934	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.0960	BAJO	1.	0.0909	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2.	0.0994		
			3.	0.0919	\bar{x}	0.0943
			4.	0.0967	SD	0.0036
			5.	0.0908	%RSD	3.8343
			6.	0.0963	CRITERIO %RSD _r ≤ 5%	
			QC	0.0984	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	0.4960	MEDIO	1	0.4957	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.4898		
			3	0.4498	\bar{x}	0.4761
			4	0.4632	SD	0.0183
			5	0.4686	%RSD	3.8338
			6	0.4895	CRITERIO %RSD _r ≤ 5%	
			QC	0.5092	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.4960	MEDIO	1	0.4703	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.4903		
			3	0.4803	\bar{x}	0.4862
			4	0.4610	SD	0.0211
			5	0.5212	%RSD	4.3343
			6	0.4939	CRITERIO %RSD _r ≤ 5%	
			QC	0.4850	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	2.4960	ALTO	1	2.4646	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4148		
			3	2.4477	\bar{x}	2.4661
			4	2.5469	SD	0.0566
			5	2.4043	%RSD	2.2969
			6	2.5183	CRITERIO %RSD _r ≤ 5%	
			QC	2.5319	CUMPLE	SI
GASEOSA	2.4960	ALTO	1	2.3283	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4466		
			3	2.5394	\bar{x}	2.4568
			4	2.4637	SD	0.0756
			5	2.5253	%RSD	3.0753
			6	2.4374	CRITERIO %RSD _r ≤ 5%	
			QC	2.4649	CUMPLE	SI

Fig D.3 Repetibilidad día 3

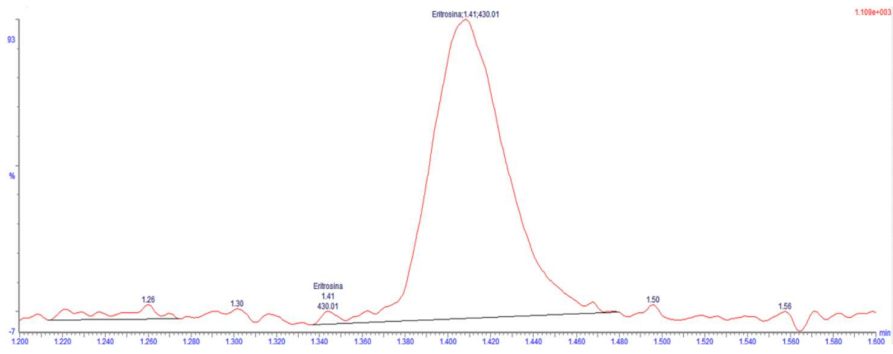


Fig D.4 Nivel bajo gaseosa

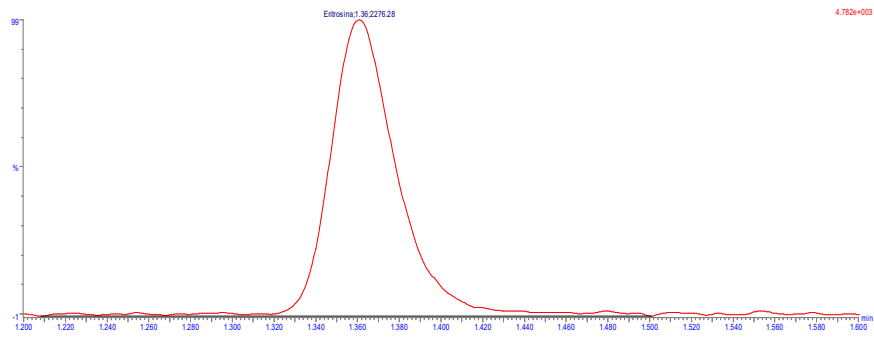


Fig D.5 Nivel medio gaseosa

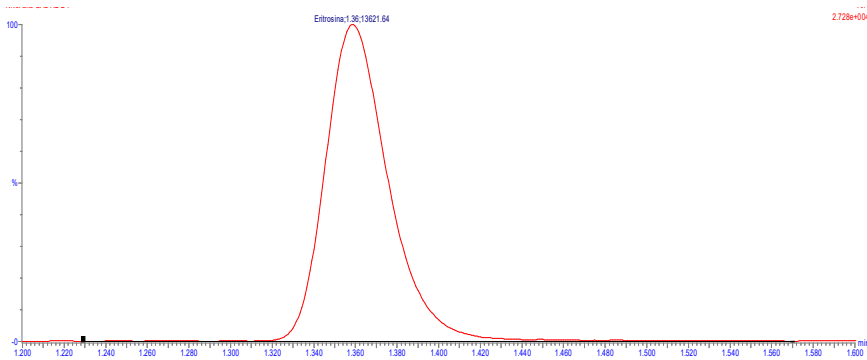


Fig D.6 Nivel alto gaseosa

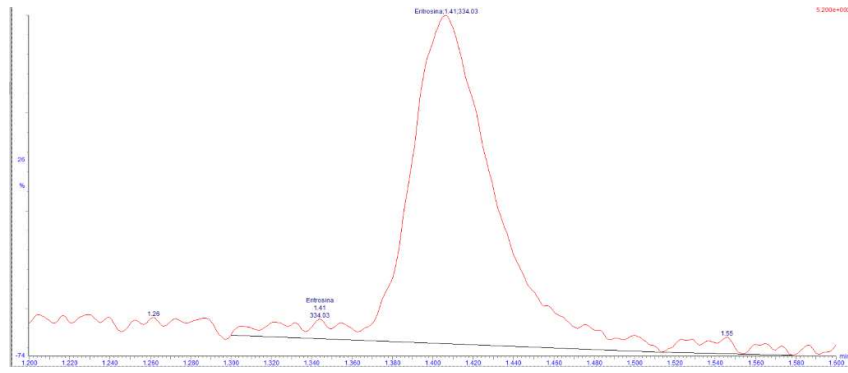


Fig D.7 Nivel bajo hidratante

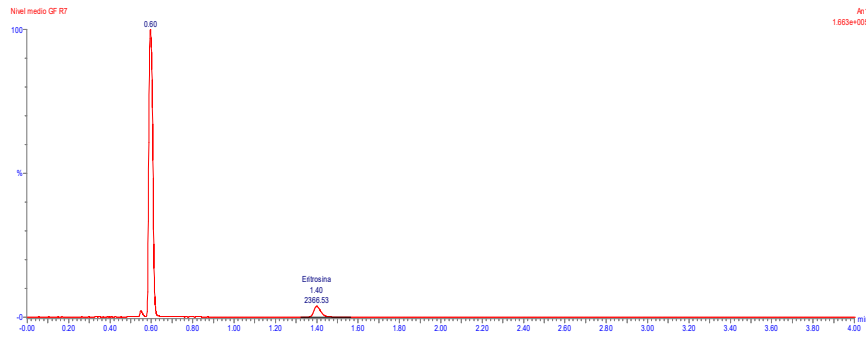


Fig D.8 Nivel medio hidratante

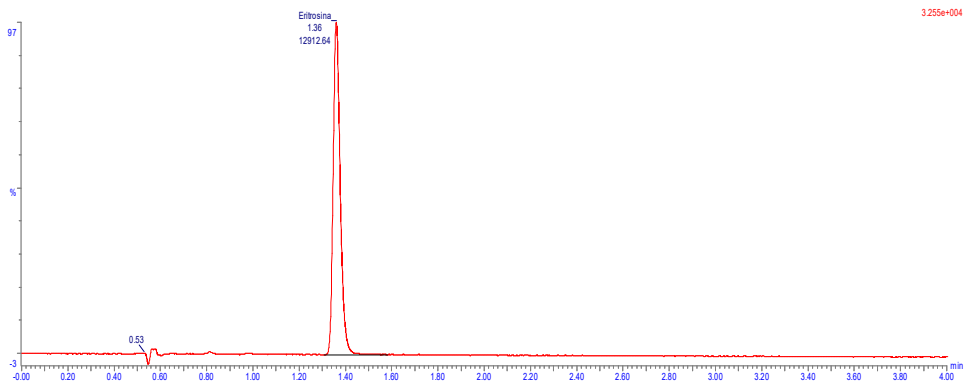


Fig D.9 Nivel alto hidratante

APÉNDICE E: PRECISIÓN INTERMEDIA

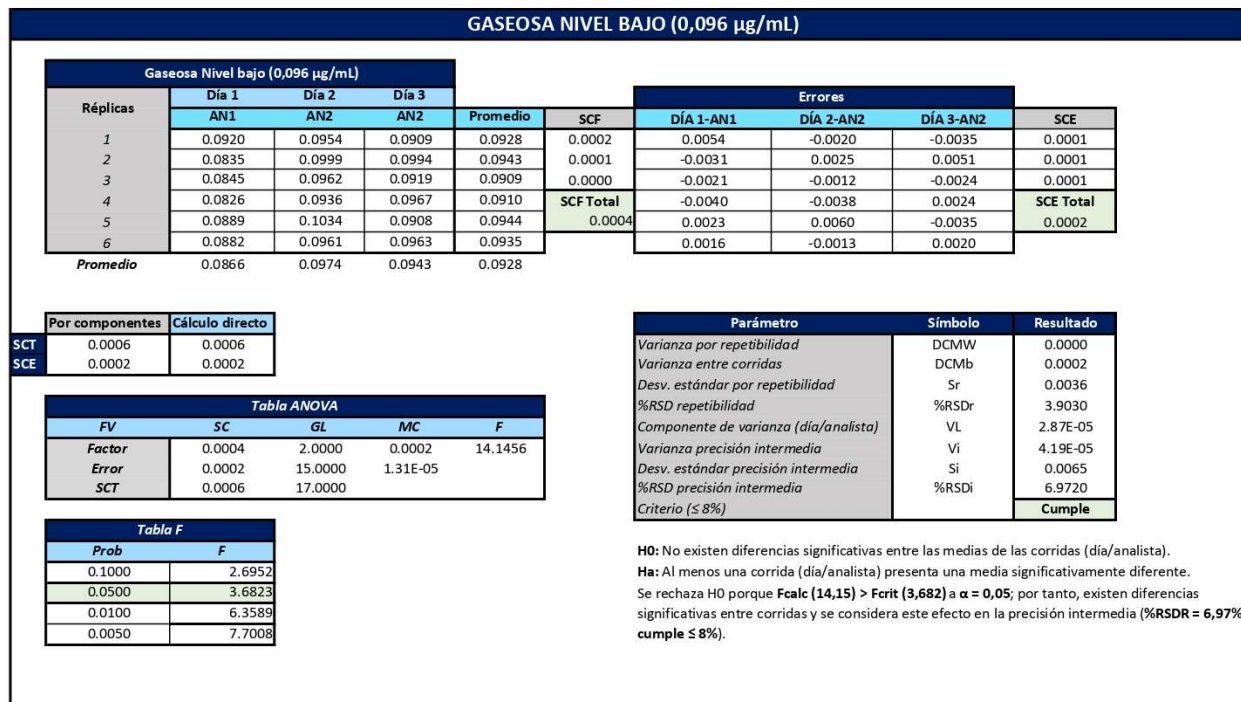


Fig E.1 Precisión intermedia gaseosa nivel bajo

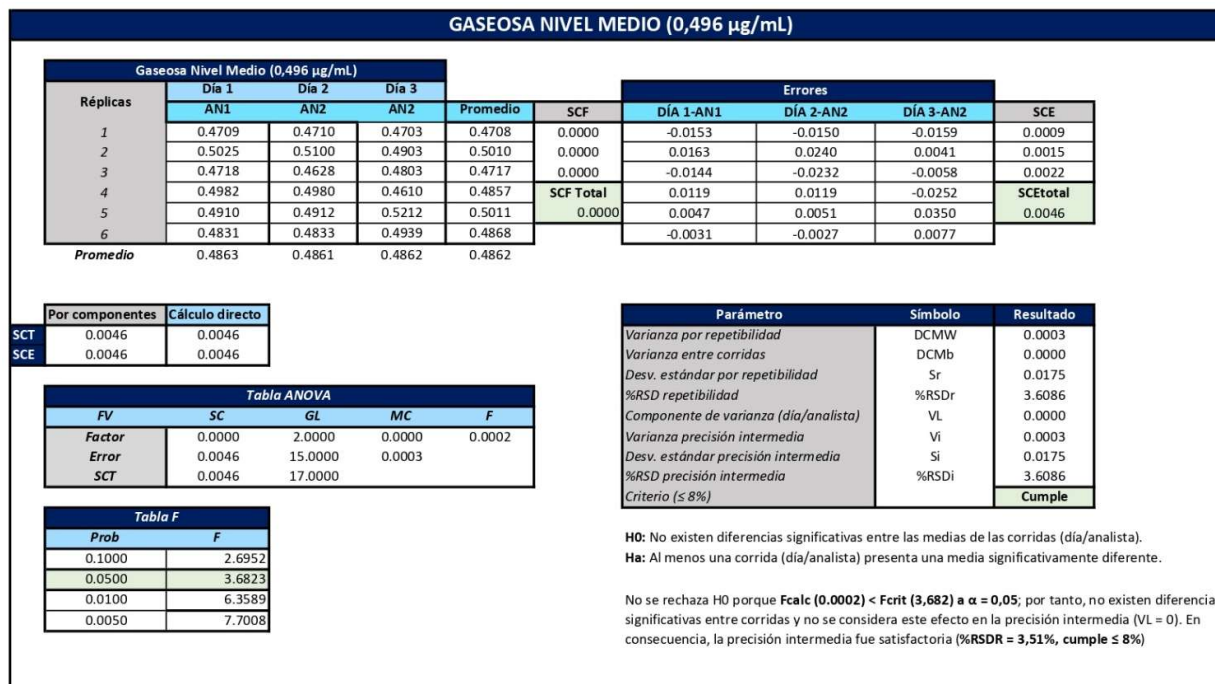


Fig E.2 Precisión intermedia gaseosa medio bajo

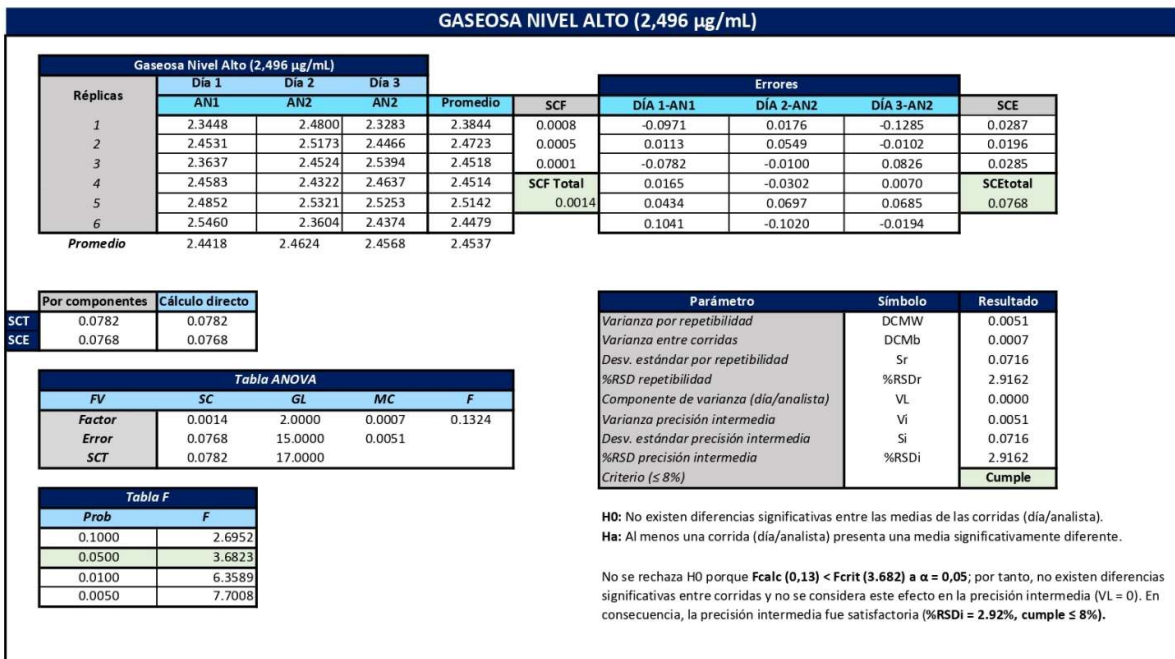


Fig E.3 Precisión intermedia gaseosa nivel alto

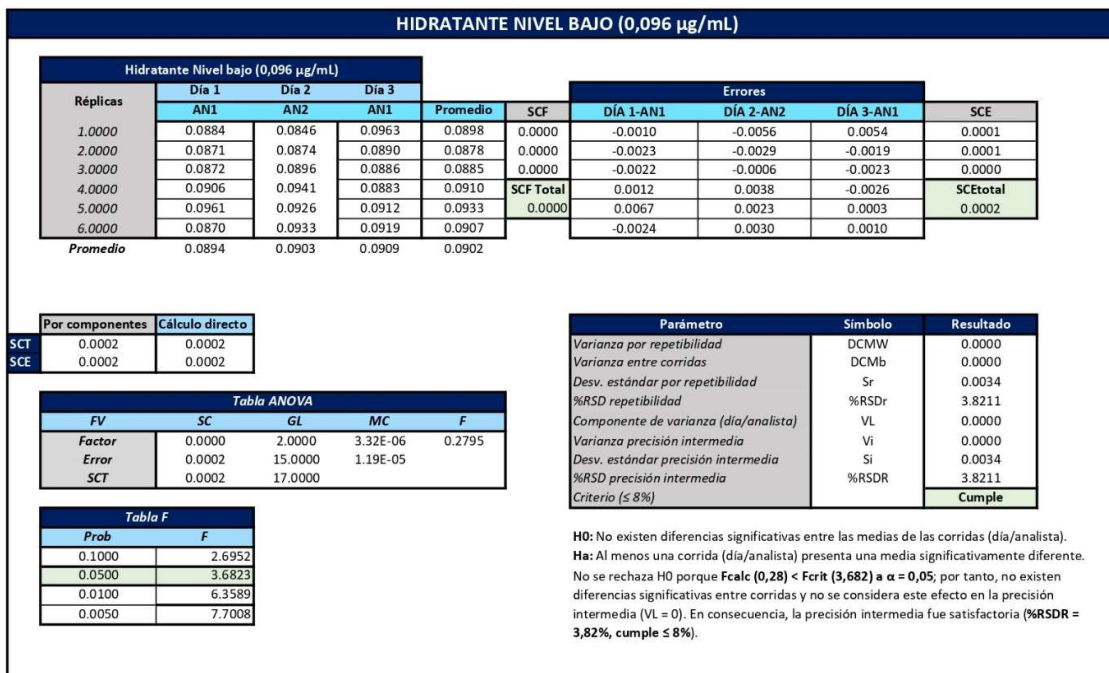


Fig E.4 Precisión intermedia hidratante nivel bajo

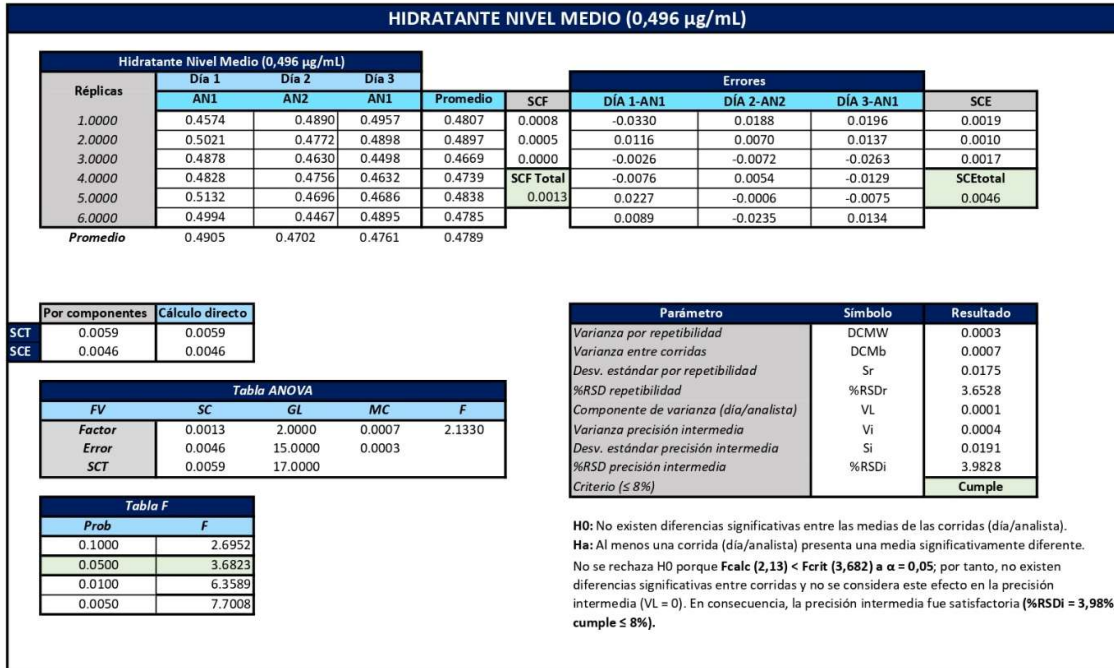


Fig E.5 Precisión intermedia hidratante nivel medio

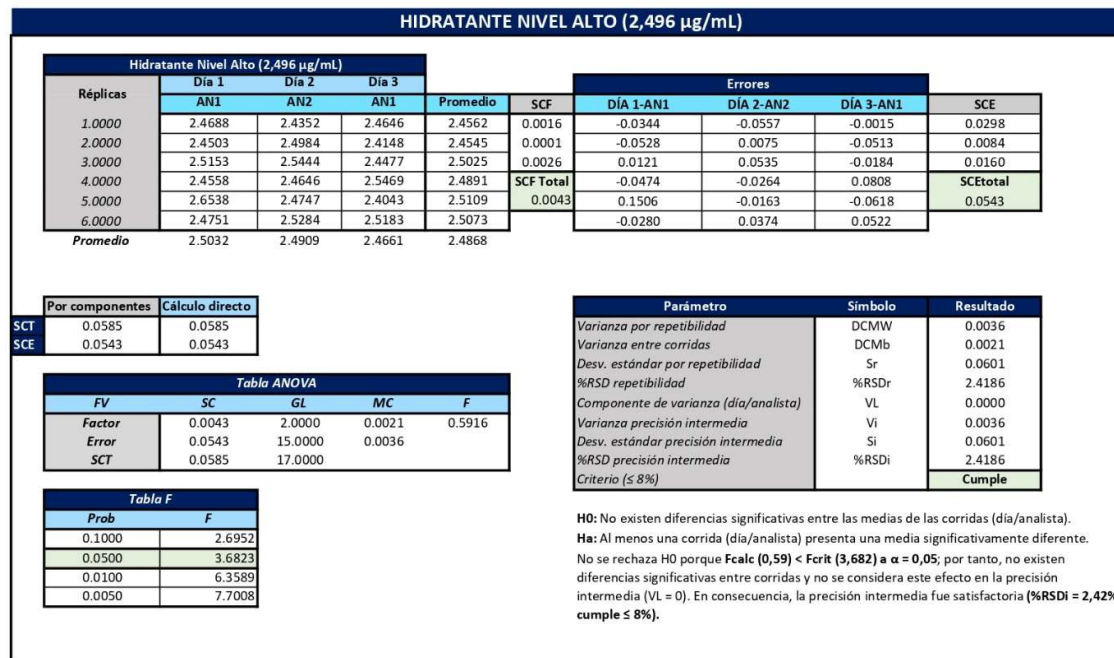


Fig E.6 Precisión intermedia hidratante nivel alto

APÉNDICE F: EXACTITUD

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)		NIVEL	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% RECUPERACIÓN POR ANÁLISIS	CÁLCULOS	
HIDRATANTE	0.0960	BAJO	1	0.0884	92.0960	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0871	90.7748		
			3	0.0872	90.8677	%REC PROMEDIO	90.8677
			4	0.0906	94.3710		
			5	0.0961	100.0902	CRITERIO	80-120 %
			6	0.0870	90.6459		
			QC	0.1045	108.8843	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.0960	BAJO	1	0.0920	95.8458	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0835	86.9655		
			3	0.0845	88.0545	%REC PROMEDIO	90.2391
			4	0.0826	86.0348		
			5	0.0889	92.6109	CRITERIO	80-120 %
			6	0.0882	91.9229		
			QC	0.0941	98.0262	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	0.4960	MEDIO	1	0.4574	92.2262	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.5021	101.2280		
			3	0.4878	98.3524	%REC PROMEDIO	98.3524
			4	0.4828	97.3424		
			5	0.5132	103.4652	CRITERIO	90-110 %
			6	0.4994	100.6795		
			QC	0.5050	101.8081	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.4960	MEDIO	1	0.4709	94.9435	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.5025	101.3135		
			3	0.4718	95.1302	%REC PROMEDIO	98.0364
			4	0.4982	100.4430		
			5	0.4910	98.9831	CRITERIO	90-110 %
			6	0.4831	97.4052		
			QC	0.4902	98.8325	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	2.4960	ALTO	1	2.4688	98.9093	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4503	98.1709		
			3	2.5153	100.7734	%REC PROMEDIO	100.7734
			4	2.4558	98.3880		
			5	2.6538	106.3211	CRITERIO	90-110 %
			6	2.4751	99.1642		
			QC	2.5777	103.2749	CUMPLE	SI
GASEOSA	2.4960	ALTO	1	2.3448	93.9415	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4531	98.2806		
			3	2.3637	94.6976	%REC PROMEDIO	97.8298
			4	2.4583	98.4894		
			5	2.4852	99.5674	CRITERIO	90-110 %
			6	2.5460	102.0024		
			QC	2.4592	98.5272	CUMPLE	SI

Fig F.1 Exactitud día 1

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)		NIVEL	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% RECUPERACIÓN POR ANÁLISIS	CÁLCULOS	
HIDRATANTE	0.0960	BAJO	1	0.0846	88.1567	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0874	91.0120		
			3	0.0896	93.3585	%REC PROMEDIO	93.3585
			4	0.0941	98.0204	CRITERIO	80-120 %
			5	0.0926	96.4110		
			6	0.0933	97.1378	CUMPLE	SI
			QC	0.1048	109.2089		
GASEOSA	0.0960	BAJO	1	0.0954	99.3784	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0999	104.0935		
			3	0.0962	100.1966	%REC PROMEDIO	101.4895
			4	0.0936	97.4805	CRITERIO	80-120 %
			5	0.1034	107.6972		
			6	0.0961	100.0907	CUMPLE	SI
			QC	0.0963	100.2735		
HIDRATANTE	0.4960	MEDIO	1	0.4890	98.5868	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.4772	96.2104		
			3	0.4630	93.3504	%REC PROMEDIO	93.3504
			4	0.4756	95.8921	CRITERIO	90-110 %
			5	0.4696	94.6731		
			6	0.4467	90.0510	CUMPLE	SI
			QC	0.4975	100.3043		
GASEOSA	0.4960	MEDIO	1	0.4709	94.9435	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.5025	101.3135		
			3	0.4618	93.1141	%REC PROMEDIO	97.7004
			4	0.4982	100.4430	CRITERIO	90-110 %
			5	0.4910	98.9831		
			6	0.4831	97.4052	CUMPLE	SI
			QC	0.4902	98.8325		
HIDRATANTE	2.4960	ALTO	1	2.4352	97.5653	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4984	100.0969		
			3	2.5444	101.9397	%REC PROMEDIO	101.9397
			4	2.4646	98.7406	CRITERIO	90-110 %
			5	2.4747	99.1454		
			6	2.5284	101.2977	CUMPLE	SI
			QC	2.3350	93.5489		
GASEOSA	2.4960	ALTO	1	2.4800	99.3579	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.5173	100.8523		
			3	2.4524	98.2546	%REC PROMEDIO	98.6540
			4	2.4322	97.4452	CRITERIO	90-110 %
			5	2.5321	101.4475		
			6	2.3604	94.5666	CUMPLE	SI
			QC	2.5383	101.6947		

Fig F.2 Exactitud día 2

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)		NIVEL	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	% RECUPERACIÓN POR ANÁLISIS	CÁLCULOS	
HIDRATANTE	0.0960	BAJO	1	0.0963	100.3364	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0890	92.7369		
			3	0.0886	92.3113	%REC PROMEDIO	92.3113
			4	0.0883	91.9469	CRITERIO	80-120 %
			5	0.0912	95.0424		
			6	0.0919	95.7420		
			QC	0.0934	97.2819	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.0960	BAJO	1	0.0909	94.6547	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.0994	103.5232		
			3	0.0919	95.7156	%REC PROMEDIO	98.2610
			4	0.0967	100.7403	CRITERIO	80-120 %
			5	0.0908	94.6036		
			6	0.0963	100.3283		
			QC	0.0984	102.5306	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	0.4960	MEDIO	1	0.4957	99.9366	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.4898	98.7405		
			3	0.4498	90.6804	%REC PROMEDIO	90.6804
			4	0.4632	93.3830	CRITERIO	90-110 %
			5	0.4686	94.4736		
			6	0.4895	98.6873		
			QC	0.5092	102.6670	CUMPLE	SI
GASEOSA	0.4960	MEDIO	1	0.4703	94.8224	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	0.4903	98.8578		
			3	0.4803	96.8441	%REC PROMEDIO	98.0224
			4	0.4610	92.9515	CRITERIO	90-110 %
			5	0.5212	105.0782		
			6	0.4939	99.5804		
			QC	0.4850	97.7804	CUMPLE	SI
HIDRATANTE	2.4960	ALTO	1	2.4646	98.7422	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4148	96.7485		
			3	2.4477	98.0657	%REC PROMEDIO	98.0657
			4	3.0000	120.1923	CRITERIO	90-110 %
			5	2.4043	96.3266		
			6	2.5183	100.8941		
			QC	2.5319	101.4376	CUMPLE	SI
GASEOSA	2.4960	ALTO	1	2.3283	93.2813	RESUMEN ESTADÍSTICO (N=6)	
			2	2.4466	98.0202		
			3	2.5394	101.7368	%REC PROMEDIO	98.4281
			4	2.4637	98.7069	CRITERIO	90-110 %
			5	2.5253	101.1720		
			6	2.4374	97.6515		
			QC	2.4649	98.7549	CUMPLE	SI

Fig F.3 Exactitud día 3

APÉNDICE G: ROBUSTEZ

BEBIDAS HIDRATANTES								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A,a</i>	A	A	A	A	a	a	a	a
<i>B,b</i>	B	B	b	b	B	B	b	b
<i>C,c</i>	C	c	C	c	C	c	C	c
<i>D,d</i>	D	D	d	d	d	d	D	D
<i>E,e</i>	E	e	E	e	e	E	e	E
<i>F,f</i>	F	f	f	F	F	f	f	F
<i>G,g</i>	G	g	g	G	g	G	G	g
<i>Resultado</i>	s	t	u	v	w	x	y	z
	1.6237	1.5400	1.5936	1.6732	1.3164	1.2838	1.6063	1.5675

Fig G.1 Resultados robustez bebidas hidratantes

BEBIDAS GASEOSAS								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A,a</i>	A	A	A	A	a	a	a	a
<i>B,b</i>	B	B	b	b	B	B	b	b
<i>C,c</i>	C	c	C	c	C	c	C	c
<i>D,d</i>	D	D	d	d	d	d	D	D
<i>E,e</i>	E	e	E	e	e	E	e	E
<i>F,f</i>	F	f	f	F	F	f	f	F
<i>G,g</i>	G	g	g	G	g	G	G	g
<i>Resultado</i>	s	t	u	v	w	x	y	z
	1.7294	1.6902	2.4464	2.0372	1.5625	1.4508	1.8040	2.1918

Fig G.2 Resultados robustez bebidas gaseosas

ANEXO H: CERTIFICADO DE ESTÁNDARES



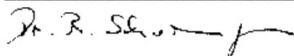
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Erythrosin B - analytical standard

Product Number: 87613
Batch Number: BCCF3674
Brand: SIAL
CAS Number: 16423-68-0
Formula: C₂₀H₆I₄Na₂O₅
Formula Weight: 879,86 g/mol
Quality Release Date: 07 MAY 2021
Date Retested: 07 NOV 2023
Recommended Retest Date: OCT 2026

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Red to Very Dark Red	Very Dark Red
Appearance (Form)	Powder or Crystals	Powder
Purity (HPLC)	≥ 98.0 %	99.1 %
LC-MS Identity	Identity Confirmed	Identity Confirmed
¹ H NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms



Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland CH

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



Version Number: 1

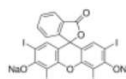
Page 1 of 1

Fig H.1 Estándar primario

Certificate of Analysis

Product Name:
 Erythrosin B – certified by the Biological Stain Commission, Dye content 90 %

Product Number: 198269
Batch Number: MKCJ1343
Brand: SIAL
CAS Number: 16423-68-0
MDL Number: MFCD00144257
Formula: C₂₀H₆I₄Na₂O₅
Formula Weight: 879.86 g/mol
Quality Release Date: 05 MAR 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Form)	Powder	Powder
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Wavelength	524 - 528 nm	527 nm
Extinction Coefficient	≥ 82500	96512
Wavelength	308 - 312 nm	309 nm
Extinction Coefficient	≥ 13000	14913
Wavelength	259 - 263 nm	261 nm
Extinction Coefficient	> 32000	36176
Dye Content		88 %
Approximately 90%		
Biological Stain Commission	Pass	Pass
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
c = 1mg/ml (0.1%), H ₂ O		
Solubility (Color)	Conforms to Requirements	Red
Red-Orange to Red		

Michael Grady, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Fig H.2 Estándar secundario