



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

UN MÉTODO CLAE-DAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN  
DEL COLOR ROJO EN MIELES PROCEDENTES DE MACHALA

CALLE MALDONADO KEVIN DAVID  
INGENIERO EN ALIMENTOS

MACHALA  
2021



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

UN MÉTODO CLAE-DAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL  
ORIGEN DEL COLOR ROJO EN MIELES PROCEDENTES DE  
MACHALA

CALLE MALDONADO KEVIN DAVID  
INGENIERO EN ALIMENTOS

MACHALA  
2021



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

UN MÉTODO CLAE-DAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN DEL COLOR  
ROJO EN MIELES PROCEDENTES DE MACHALA

CALLE MALDONADO KEVIN DAVID  
INGENIERO EN ALIMENTOS

CUESTA RUBIO OSMANY

MACHALA, 26 DE ABRIL DE 2021

MACHALA  
2021

# Un método CLAE-DAD para la identificación del origen del color rojo en mieles procedentes de Machala

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

2%

INDICE DE SIMILITUD

1%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

---

## ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

---

< 1%

★ [www.tek.org.tr](http://www.tek.org.tr)

Fuente de Internet

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 6 words

Excluir bibliografía

Activo

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, CALLE MALDONADO KEVIN DAVID, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado UN MÉTODO CLAE-DAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN DEL COLOR ROJO EN MIELES PROCEDENTES DE MACHALA, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 26 de abril de 2021



CALLE MALDONADO KEVIN DAVID  
0706485448

## **AGRADECIMIENTO**

Gracias a mi madre y hermanos, por el amor y el apoyo brindado a lo largo de mi vida.

A mi tutor, el profesor Osmany Cuesta Rubio, por la confianza, paciencia y la guía para lograr culminar este importante trabajo.

A mis docentes.

A mis amigos.

Muchas gracias a todos.

**Kevin David Calle Maldonado**

## RESUMEN

La aparición de una miel de coloración roja en la ciudad de Machala despertó el interés en la comunidad científica debido a que la apariencia normal de las mieles va según la FAO de tonalidades de blanco agua a marrón oscuro/negro. Existe un antecedente de miel roja en Utah - Estado Unidos, donde se alimentaban a las abejas con jarabes preparados con dulces que poseían colorantes artificiales. Los colorantes artificiales son regulados por organismos internacionales como JECFA, esta organización ha estudiado las dosis máximas de consumo de cada colorante y su ingesta diaria admisible (IDA) para que el consumo de los mismos sea seguro. Al no conocer que compuesto origina el color rojo en las mieles de Machala, ni la concentración del mismo, no es posible asegurar su inocuidad.

La no existencia de un método para la determinación del origen del color rojo en mieles nos lleva a desarrollar el método de cromatografía líquida de alta eficacia con detector de diodos (CLAE-DAD) para tal finalidad.

Para ello, cuatro muestras de mieles de coloración roja fueron suministradas por apicultores de la Ciudad de Machala entre enero de 2019 y octubre de 2020, se añadió una quinta muestra de miel que no presenta coloración rojiza para realizar comparaciones. Dado que las mieles son matrices alimenticias complejas se realizó una extracción en fase sólida para separar el pigmento de los carbohidratos fundamentales en mieles como glucosa y fructosa.

Para la ejecución del método se empleó una columna RP-18, las fases móviles empleadas fueron la mezcla metanol: acetonitrilo (7:3, v/v) (Fase A) y 20 mM de formiato de amonio en 0,1 % de ácido fórmico (solvente B). El gradiente empleado fue: 0-3 min, isocrático con 90 % B; 3-10 min, gradiente lineal de 90-50 % B y de 10-17 min recuperación de las condiciones iniciales.

Todas las muestras de miel de coloración rojiza (Miel 1-4) mostraron un pico cromatográfico similar en cuanto a tiempo de retención y espectro UV, lo que sugiere un mismo

compuesto causante de la coloración de las mieles objeto de estudio. Dicho compuesto es el Ponceau 4R.

Se aplicó el método del patrón externo para cuantificar el pigmento presente en las muestras de mieles. Para tal efecto, se realizó el procedimiento habitual preparando disoluciones del patrón en el rango 0,08-0,38 mg/mL, teniendo como resultado concentraciones en las muestras de miel 1 y 2 de 0,182 y 0,183 mg Ponceau 4R/g miel. Cabe recalcar que la comisión del Codex Alimentarius señala que el uso de aditivos alimentarios no está permitido en mieles. Por lo tanto, la presencia de este pigmento en las mieles de Machala podría constituir un impedimento para su uso y/o comercialización. Además, su concentración supera con creces la dosis máxima permitida por la JECFA la cual establece el limite en 50 mg/kg y las mieles 1 y 2 superan los 100mg/kg.

Se concluye que el procedimiento CLAE-DAD implementado permitió sugerir que el pigmento causante del color de las mieles rojas de Machala es el Ponceau 4R y que, la EFS es un método conveniente para separar el pigmento de las muestras de mieles rojas de los carbohidratos.

**Palabras clave:** *Miel, CLAE-DAD, colorante.*



## ABSTRACT

The appearance of a red-colored honey in the city of Machala aroused interest in the scientific community because, according to the FAO, the normal appearance of honeys ranges from watery white to dark brown / black. There is a history of red honey in Utah - United States, where bees were fed syrups prepared with sweets containing artificial colors. Artificial colors are regulated by international organizations such as JECFA, this organization has studied the maximum consumption levels of each color and its acceptable daily intake (ADI) so that their consumption is safe. Not knowing which compound causes the red color in Machala honeys, nor its concentration, it is not possible to ensure its safety. The non-existence of a method for determining the origin of the red color in honeys leads us to develop the high efficiency liquid chromatography method with diode detector (CLAE-DAD) for this purpose.

For this, four samples of red-colored honeys were supplied by beekeepers from the City of Machala between January 2019 and October 2020, a fifth sample of honey that does not present reddish coloration was added to make comparisons. Since honeys are complex food matrices, a solid phase extraction was carried out to separate the pigment from the fundamental carbohydrates in honeys such as glucose and fructose.

For the execution of the method, a RP-18 column was used, the mobile phases used were the mixture methanol: acetonitrile (7: 3, v / v) (Phase A) and 20 mM of ammonium formate in 0.1% acid formic (solvent B). The gradient used was: 0-3 min, isocratic with 90% B; 3-10 min, linear gradient of 90-50% B and 10-17 min recovery from initial conditions.

All the reddish colored honey samples (Honey 1-4) show a similar chromatographic peak in terms of retention time and UV spectrum, which suggests the same compound that causes the coloration of the honeys under study. This compound is Ponceau 4R.

The external standard method was applied to quantify the pigment present in the honey samples. For this purpose, the usual procedure was carried out preparing solutions of the

standard in the range 0.08-0.38 mg / mL, resulting in concentrations in honey samples 1 and 2 of 0.182 and 0.183 mg Ponceau 4R / g honey. It should be noted that the Codex Alimentarius commission points out that the use of food additives is not allowed in honeys. Therefore, the presence of this pigment in Machala honeys could constitute an impediment to its use and / or commercialization. In addition, its concentration far exceeds the maximum dose allowed by JECFA which establishes the limit at 50 mg / kg and honeys 1 and 2 exceed 100mg / kg.

It is concluded that the CLAE-DAD procedure implemented to suggest that the pigment causing the color of the red honeys of Machala is Ponceau 4R and that the EFS is a convenient method to separate the pigment of the red honeys samples from the carbohydrates.

**Keywords:** Honey, CLAE-DAD, dye.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b><i>INTRODUCCIÓN</i></b>	<b>9</b>
<b><i>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</i></b>	<b>10</b>
<b>1.1. Miel</b>	<b>10</b>
1.1.1. Composición química	10
1.1.2. Pigmentos en mieles	11
<b>1.2. Colorantes</b>	<b>12</b>
1.2.1. Colorantes Naturales	13
1.2.2. Colorantes Artificiales	14
1.2.3. Ingesta Diaria Admisible (IDA)	16
1.2.4. Dosis máxima	16
1.2.5. Efectos perjudiciales de los colorantes artificiales	17
<b>1.3. Métodos cualitativos y cuantitativos para colorantes</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)</b>	<b>18</b>
1.4.1. Preparación de la muestra	20
1.4.2. La extracción en fase sólida (EFS)	21
1.4.3. Sistema de detección	21
<b><i>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</i></b>	<b>21</b>
<b>2.1. Reactivos y materiales</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Equipos de uso general</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Muestras de miel</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Extracción en fase sólida</b>	<b>22</b>
<b>2.5. Análisis CLAE-DAD</b>	<b>23</b>

<b>2.6. Análisis cualitativo</b>	<b>23</b>
<b>2.7. Análisis cuantitativo</b>	<b>24</b>
<b><i>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i></b>	<b>24</b>
<b>3.1. Resultados previos</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Extracción en fase sólida</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Análisis CLAE-DAD</b>	<b>27</b>
3.3.1. Estudio cualitativo	27
3.3.2. Estudio cuantitativo	33
<b><i>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES</i></b>	<b>35</b>
<b><i>CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES</i></b>	<b>35</b>
<b><i>REFERENCIAS</i></b>	<b>36</b>
<b><i>ANEXOS</i></b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructura Química de Colorantes Sintéticos Solubles en Agua. ....	15
<b>Figura 2</b> Cartucho Hypersep C18 con el Pigmento Rojo Retenido en la Parte Superior .....	26
<b>Figura 3</b> Cromatogramas del Pigmento Rojo Aislado de la Muestra de Miel .....	28
<b>Figura 4</b> Cromatogramas a 510 nm del Pigmento de la Muestra Miel 1(A), Patrones Amaranto (B) y Ponceau 4R (C). Espectros UV-Visible de los Tres Picos.....	30
<b>Figura 5</b> Equipo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific).....	42
<b>Figura 6</b> Acondicionamiento del Cartucho Para la EFS.....	42
<b>Figura 7</b> Diluciones de las Muestras de Mieles y del Ponceau 4R.....	43
<b>Figura 8</b> Obtención del Área Bajo la Curva Mediante el Software Xcalibur 2.2.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Colorantes Naturales de Color Rojo.....	13
<b>Tabla 2</b> Colorantes Artificiales de Color Rojo.....	15
<b>Tabla 3</b> Técnicas Analíticas Para la Determinación de Colorantes Alimentarios. ....	17
<b>Tabla 4</b> Ejemplos de Sistemas Cromatográficos Para la Detección de Colorantes Alimenticios.....	19
<b>Tabla 5</b> Condiciones Cromatográficas Para la Detección de Amaranto y Ponceau 4R. ....	20
<b>Tabla 6</b> Resultados Obtenidos del Análisis Cuantitativo por CLAE-DAD .....	33

## INTRODUCCIÓN

El KSL en el año 2013 informó sobre la aparición de mieles rojas en Utah - Estados Unidos, procedentes de abejas alimentadas con jarabes preparados con edulcorantes artificiales. En el año 2019 durante un muestreo realizado en la provincia de El Oro se encontraron mieles de color rojo que eran expandidas por un apicultor artesanal en la ciudad de Machala, despertando el interés de la comunidad universitaria. Cabe recalcar que, el color original de las mieles va de tonalidades de blanco agua a marrón oscuro/negro (FAO, 2020), sin embargo, la tonalidad encontrada en estas mieles difiere notablemente de lo habitual, lo cual puede deberse a la presencia de pigmentos naturales o a colorantes artificiales. De comprobarse el último caso, esto podría afectar la salud del consumidor en el caso de poseer colorantes artificiales no permitidos y estar en concentraciones muy elevadas.

Por otro lado, existen métodos planteados para evaluar el color usual de las mieles, sin embargo, no se ha encontrado una metodología para la identificación del origen del color rojo en las mieles. Debido a esto, se ha generado la necesidad de implementar un método que permita identificar el tipo de compuestos presentes en la miel roja, así como sus concentraciones. El método CLAE-DAD es una técnica que podría ser aplicado en este tipo de determinaciones. Debido a los antecedentes mencionados, el presente estudio pretende implementar un método CLAE-DAD que permita la identificación del origen del color rojo de mieles procedentes de Machala.

## **Problema**

Desconocimiento de un método de CLAE-DAD para la identificación del origen del color rojo en mieles procedentes de Machala.

## **Objetivo General**

Implementar un método de CLAE-DAD para la identificación del origen del color rojo en mieles procedentes de Machala.

## **Objetivos Específicos**

Aplicar un método de extracción en fase sólida para el fraccionamiento de las mieles.

Identificar y cuantificar el pigmento responsable del color en las mieles.

# **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Miel**

Como se expresa en la normativa emitida por la Comisión del Codex Alimentarius referente a la miel donde es definida como:

La miel es una sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de estas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje. (Comisión del Codex Alimentarius, 2019, p. 2)

### **1.1.1. Composición química**

Las mieles han sido estudiadas alrededor del mundo por diversos investigadores, teniendo como principales componentes a los monosacáridos glucosa y fructosa (Finola et al., 2007); cabe recalcar que el porcentaje de azúcares presentes en la miel dependerá de las materias primas usadas para procesarla (Queiroz et al., 2007). También podemos encontrar

otros componentes en menor proporción como: proteínas, enzimas, aminoácidos, compuestos fenólicos, pigmentos, minerales, vitaminas y ácidos orgánicos (de Almeida-Muradian et al., 2014; Machado De-Melo et al., 2018; Tischer Seraglio et al., 2019).

### **1.1.2. Pigmentos en mieles**

Según Belay et al. (2015), el color es el factor más importante que determina los precios de importación y los precios mayoristas de la miel. Los principales responsables del color son los pigmentos provenientes de las plantas de donde la abeja haya recolectado el néctar; estos otorgan a la miel tonalidades que van desde blanco agua a marrón oscuro/negro acorde a lo mencionado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2020).

Los más importantes compuestos responsables del color de las mieles son los polifenoles, carotenoides, xantofilas y antocianinas, que pueden agruparse en pigmentos solubles en agua y solubles en lípidos (Machado De-Melo et al., 2018). Otros compuestos que pueden contribuir al color de la miel son los azúcares, minerales y aminoácidos. Así como también, aunque con menor impacto, los ácidos orgánicos alifáticos de bajo peso molecular, llamados LMMAOA por sus siglas en inglés, a este grupo pertenecen compuestos como: ácido maleico, cítrico, malónico, fumárico, tartárico, fórmico, glucónico, málico, propiónico, etc. (Machado De-Melo et al., 2018; Tischer Seraglio et al., 2019).

Por otro lado, Finola et al. (2007) afirma que el contenido de minerales influye en el color, las mieles de color claro generalmente tienen un contenido bajo, por debajo de 0.1 %, mientras que las mieles de color oscuro generalmente tienen un mayor contenido. Además, el color de las mieles oscuras está fuertemente relacionado con las concentraciones de Cd, Fe y Pb, mientras que el color de las mieles pálidas con concentraciones de Al y Mg (González-Miret et al., 2005).



Las mieles de color oscuro tienen más contenido de compuestos fenólicos lo que conlleva a un mayor poder antioxidante (Alvarez-Suarez et al., 2014; Bertonecelj et al., 2007; Özcan y Ölmez, 2014), aunque uno de los factores que también influyen en el color oscuro de la miel acorde a lo mencionado por Belay et al. (2015), es la exposición al calor y el tiempo que esta pudo haber estado almacenada, estos factores propician la reacción de Maillard la cual genera melanoidinas como resultado.

Dado que la composición química de la miel varía en dependencia de la flora que se encuentra cercana a la colmena, es evidente que las mieles recolectadas en distintos lugares van a presentar una composición química diferente y por lo tanto diferentes tonalidades (Özcan & Ölmez, 2014).

## **1.2. Colorantes**

Los colorantes son el grupo más interesante de aditivos alimentarios ya que son usados para cambiar el aspecto visual de un alimento, para hacerlo apetecible y promover su compra (Amchova et al., 2015; Ma et al., 2006). Los colorantes se utilizan en los alimentos según la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, 2018), por varias razones: 1) para compensar la pérdida de color debido a la exposición a la luz, el aire, temperaturas extremas, humedad y condiciones de almacenamiento; 2) corregir las variaciones naturales de color; 3) para realzar los colores que existen naturalmente; y 4) dar color a alimentos incoloros.

Los colorantes alimentarios se pueden clasificar en tres grupos; colorantes naturales, colorantes idénticos a los naturales, que, aunque sintetizados en las industrias, imitan a los naturales y finalmente a los colorantes artificiales/sintéticos (Carocho et al., 2015; Chai et al., 2016; Rocío Sánchez, 2013).

Las primeras directrices sobre normas alimentarias fueron establecidas como Codex Alimentarius por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1962, para armonizar la regulación de los aditivos alimentarios en todo el mundo. La Autoridad Europea

de Seguridad y Alimentos (EFSA) y la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos son las organizaciones reguladoras más importantes facultadas para garantizar la calidad y seguridad de los productos relacionados con los alimentos (Ramesh & Muthuraman, 2018). Existe un gran número de colorantes en la industria alimentaria, actualmente 82, para identificarlos de mejor manera se generó un sistema de numeración E (Comisión del Codex Alimentarius, 2015), donde los colorantes son agrupados entre los números E100 y E200.

### **1.2.1. Colorantes Naturales**

El color natural se define como cualquier tinte, pigmento o cualquier otra sustancia obtenida de vegetales, animales o minerales. Los colores pueden provenir de una variedad de fuentes, como semillas, frutas, verduras, algas e insectos (Ramesh & Muthuraman, 2018). Con la finalidad de eliminar materiales indeseables, estos se purifican y concentran antes de su uso (Rocío Sánchez, 2013). Los colorantes naturales de origen vegetal son de mayor interés dado que imparten efectos positivos sobre la salud humana, aunque, estos presentan menor estabilidad y mayor reactividad con otros componentes alimenticios (Różyło, 2020).

Dentro de estos colorantes naturales se encuentran el color caramelo, clorofilas, antocianinas, carotenoides, xantofilas, carbonato de calcio, óxido ferroso, entre otros. Los colorantes naturales de color rojo que son de nuestro interés son presentados en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Colorantes Naturales de Color Rojo.*

<b>Colorantes Naturales</b>				
<b>Nombre</b>	<b>IDA</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Usos</b>	<b>Referencias</b>
Cochinilla E120	5 mg/kg	Del caparazón seco de las hembras fecundadas del insecto cochinilla del nopal	Tartas, galletas, bebidas, mermelada, gelatina, helados, salchichas, tartas, yogur, gelatinas, sidra, tomate, productos lácteos, cerezas, bebidas no carbonatadas, chicle	(EFSA, 2015d)

Betanina E162	N.E	Por prensado y extracción de la remolacha	Productos de pastelería, chicle, yogur, salsas, postres	(EFSA, 2015b)
Antocianinas E163	2.5 mg/kg	Por extracción de moras, fresas, grosellas, uvas, frambuesas, maíz negro.	Bebidas, queso, confituras, helados y productos lácteos aromatizados.	(EFSA, 2013b)
Óxidos e hidróxidos de hierro E172	0.5 mg/kg	Se obtiene de la oxidación del hierro	Grageas, dulces, recubrimientos, aceitunas, corteza de queso.	(EFSA, 2015c)

*IDA expresada en: mg/kg pc/día (peso corporal/día)*

*N.E: No especificado*

### **1.2.2. Colorantes Artificiales**

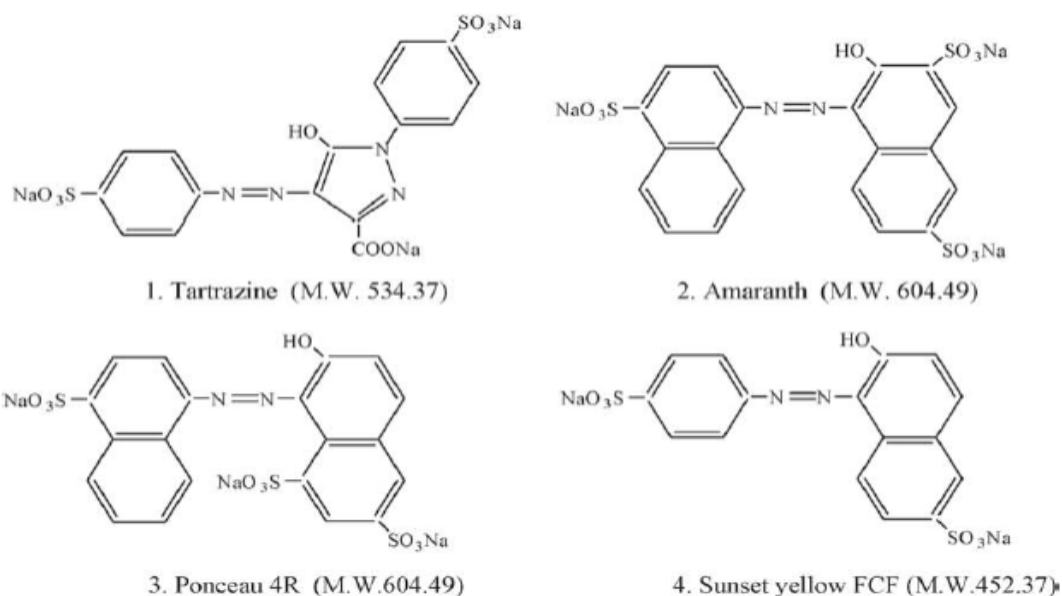
Los colorantes azoicos y otros que contienen residuos policíclicos derivados de xanteno y antraquinona son colorantes artificiales. Los colorantes azoicos imparten un color fuerte e intenso a los productos alimenticios (Ramesh & Muthuraman, 2018), y de acuerdo a estos autores, más del 90% de los tintes artificiales que se fabrican son utilizados principalmente en alimentos. Además, según la EFSA, aproximadamente el 70% de todos los colorantes utilizados en la fabricación de alimentos son colorantes azoicos (König, 2015).

Debido a que los costos de producción de los colorantes artificiales alimenticios son menores a los costos de producción de los naturales, los sintéticos son más utilizados para el uso en alimentos, se suma a esto la alteración y pérdida de los colorantes naturales propio de los alimentos durante el proceso de producción de los mismos y la mayor estabilidad de los colorantes artificiales (Ma et al., 2006).

Los colorantes artificiales se pueden clasificar principalmente en dos tipos: colorantes solubles en agua y colorantes solubles en grasas. Los solubles en agua comúnmente usados y permitidos son: Amaranth, Brilliant Blue FCF, Ponceau 4R, Sunset Yellow FCF, y Tartrazine por sus nombres en inglés (Fig. 1). Por otro lado, los colorantes solubles en grasa más usados son: Sudan I, Sudan II, Sudan III, y Sudan IV (Ma et al., 2006).

**Figura 1**

*Estructura Química de Colorantes Sintéticos Solubles en Agua.*



Los colorantes artificiales de color rojo aprobados en el Codex Alimentario son representados en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Colorantes Artificiales de Color Rojo.*

Nombre	Tipo	Usos	Referencias
Azorubina E122	Azo	Mermeladas, jaleas, yogures, caramelos, helados, postres.	(Bonan et al., 2013; EFSA, 2009b)
Amaranto E123	Azo	Caramelos, productos de pastelería, Bebidas alcohólicas y no alcohólicas	(Bonan et al., 2013; EFSA, 2013a; Ma et al., 2006; Qi et al., 2015)
Ponceau 4R E124	Azo	Caramelos, productos de pastelería, helados y en sucedáneos de caviar y derivados cárnicos	(Bonan et al., 2013; EFSA, 2015a; Ma et al., 2006; Qi et al., 2015)
Eritrozina E127	Xantano	Caramelos, cócteles y cerezas confitadas, paletas heladas y geles para decorar pasteles.	(EFSA, 2011; Vojdani & Vojdani, 2015)
Allura AC E129	Azo	Golosinas, helados, postres, refrescos, carnes procesadas	(Al-Degs, 2009; Bonan et al., 2013; EFSA, 2009a)

Por otro lado, los colorantes forman parte de los aditivos usados en la industria alimentaria, a los cuales la Comisión del Codex Alimentarius (2019a) en la normativa emitida para regular estos aditivos, señala las dosis máximas de uso en alimentos y su respectiva ingesta diaria admisible; lo cual pretende asegurar que el consumo de estos aditivos no sea excesivo y conlleve a un riesgo para la salud, debido a que según Al-Degs (2009), los colorantes artificiales contienen grupos funcionales azo (N = N) y anillos aromáticos, por lo que son perjudiciales para la salud humana. Debido al fuerte impacto de los colorantes se creó el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA).

La dosis máxima para los colorantes basado en lo establecido por la JECFA en el Codex Alimentarius (2019a), establece para Amaranto 100 mg/kg y para Ponceau 4R 50 mg/kg, mientras que la IDA para estos mismos colorantes es 0 – 0.5 mg/kg y 0 – 4.0 mg/kg respectivamente.

### ***1.2.3. Ingesta Diaria Admisible (IDA)***

La IDA es una estimación efectuada por el JECFA de la cantidad de aditivo alimentario, expresada en relación con el peso corporal, que una persona puede ingerir diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para su salud (Comisión del Codex Alimentarius, 2019a; Duffus et al., 2007).

### ***1.2.4. Dosis máxima***

La dosis máxima de uso de un aditivo descrito por la Comisión del Codex Alimentarius (2019a), es la concentración más alta de este que es funcionalmente eficaz en un alimento o categoría de alimentos y que es inocua. Por lo general se expresa como mg de aditivo por kg de alimento. Cabe recalcar que la Comisión del Codex Alimentarius (2019b), expresa que el uso de aditivos alimentarios para la miel no está permitido.

### **1.2.5. Efectos perjudiciales de los colorantes artificiales**

Una revisión realizada por Vojdani y Vojdani (2015) que analiza la reactividad de los colorantes artificiales concluye que los colorantes alimentarios pueden causar los siguientes problemas: una falla en la tolerancia oral, interferencia con las enzimas digestivas, mayor permeabilidad intestinal, toxicidad hepática, disfunción mitocondrial, reactividad inmune a los alimentos, hipersensibilidad, dermatitis atópica, rinitis alérgica, asma, angioedema, trastornos neuroconductuales, interferencia con la neurotransmisión y anomalías reproductivas. Ha habido una creciente preocupación respecto a que los colorantes alimentarios puedan contribuir al desarrollo del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en los niños.

### **1.3. Métodos cualitativos y cuantitativos para colorantes**

Así como los demás ingredientes alimenticios, los colorantes deben ser reportados en las etiquetas de los alimentos, algunas de estas sustancias suponen un riesgo potencial para la salud humana y pueden provocar reacciones alérgicas en determinadas poblaciones si se excede las concentraciones permitidas por los entes reguladores. En consecuencia, son necesarios métodos de determinación precisos y confiables para estos aditivos alimentarios, para el uso adecuado de estos ingredientes y por garantías de seguridad alimentaria (Gao et al., 2013).

Se han informado muchas técnicas analíticas para la determinación de varios colorantes alimentarios artificiales, tal como lo muestra la tabla 3.

**Tabla 3**

*Técnicas Analíticas Para la Determinación de Colorantes Alimentarios.*

<b>Técnica</b>	<b>Observación</b>	<b>Referencia</b>
----------------	--------------------	-------------------

-Cromatografía en capa delgada (CCD) -Voltamperometría de adsorción -La polarografía diferencial de pulsos -La electroforesis capilar -Espectrofotometría	Los métodos mencionados son simples, pero no adecuados para la determinación de múltiples aditivos alimentarios en matrices alimentarias.	(Oka et al., 1987, 1994) (Ni et al., 1997) (Combeau et al., 2002) (Huang et al., 2002) (Dinç et al., 2002)
Cromatografía líquida de alta eficacia	Es el método preferido debido a su resolución, sensibilidad y selectividad.	(Feng et al., 2011; Gao et al., 2013; Ma et al., 2006; Maria de Souza Santos Cheibub et al., 2020; Martin et al., 2016; Qi et al., 2015)

#### 1.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

La cromatografía líquida es una técnica de separación común y bien establecida que se utiliza con frecuencia para resolver múltiples problemas analíticos, ya que es capaz de separar mezclas complejas de compuestos de bajo y alto peso molecular con diferentes polaridades y propiedades ácido-base, y cuantificarlos en diversas matrices alimentarias. En dependencia del detector empleado se pueden alcanzar límites de detección que pueden llegar a las ppt (Bajkacz & Kycia-Słocka, 2020).

La CLAE ha sido usada para la separación, determinación cualitativa y cuantitativa de colorantes sintéticos. Esta técnica asegura la separación de muchas mezclas de componentes de manera apropiada para que el detector logre identificarlo y determinarlo cuantitativamente. El fundamento de la separación es la diferencia en la afinidad de los componentes con respecto a la fase estacionaria y la fase móvil, es decir, si un componente interacción más con la fase estacionaria, este será retenido más tiempo en la columna, por otro lado, si este componente es más afín a la fase móvil, saldrá de la columna con más rapidez debido a que este será arrastrado por la fase móvil (Lozano-Sánchez et al., 2018).

Las modalidades de CLAE más populares son la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa y la cromatografía líquida de alta eficacia de ion-par. En el sistema de fase reversa, la fase estacionaria es ligeramente polar o no polar, mientras que la fase móvil es polar (acetonitrilo, metanol, agua). En las tablas 4 y 5 se muestran ejemplos de sistemas cromatográficos empleados en la detección de colorantes alimenticios.

**Tabla 4**

*Ejemplos de Sistemas Cromatográficos Para la Detección de Colorantes Alimenticios.*

Column	Mobile phase	Flow rate (ml/min)/time of analysis (min)	Detector	Ref.
C <sub>18</sub> (25 cm–4.6 mm, 5 μm)	(A) Tetrabutylammonium dihydrogen phosphate in Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> (B) A/methanol (1:4) (gradient elution 45–100%A)	1/35	UV-DAD	[29]
Kromasil C <sub>18</sub> (25 cm–4.6 mm, 5 μm) (Fig. 1)	(A) 10 mM tetrabutylammonium dihydrogen phosphate buffer (pH 4.2) (B) Acetonitrile (isocratic elution 45:55%)	1/25	Spectroflow	[30]
Kromasil C <sub>18</sub> (25 cm–4.6 mm, 5 μm)	(A) Acetonitrile (B) 10 mM phosphate buffer (pH 4.2) (isocratic elution 20:80%)		575	
Tracer Analitica ODS (15 cm–4 mm, 5 μm)	(A) Methanol (B) Ammonium acetate 40 mM (pH 5), (gradient elution 10–75% A)	1/20	UV-vis (Uvicon 923)	[31]
C <sub>18</sub> (25 cm–4.6 mm, 5 μm) (Fig. 2)	(A) Acetonitrile:methanol (20:80) (B) 1% Ammonium acetate buffer (pH 7.5), (gradient elution 100–47.5% A)	1.5/31	UV-DAD	[32]
ODS Zorbax (25 cm–4.6 mm, 5 μm)	I. (A) Methanol/(B) ammonium acetate (0.08 mol/L) II. (A) Methanol/(B) EDTA* (5 × 10 <sup>-3</sup> mol/L) + sodium acetate (3 × 10 <sup>-2</sup> mol/L, (pH 3.5) (I and II 45:55% isocratic elution)	1/5	UV-DAD	[33]
C <sub>18</sub> (25 cm–4.6 mm, 5 μm)	0.25% Tryton X-100 water solution + phosphate buffer (pH 7) (50 mM/L)	1/8	UV-DAD	[34]
Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> Rapid resolution (50–4.6 mm, 1.8 μm)	(A) 0.1 mol/l water solution ammonium acetate (pH 6.7) (B) Acetonitrile/methanol (50:50 v/v)	1.5/19	UV-DAD	[35]
Cosmosil C <sub>18</sub> (125–2 mm, 5 μm)	(A) Triethylamine + acetic acid (pH 6.2) (B) Methanol (gradient elution 95–30% A – 35 min, 30–95% – 5 min)	0.2/40	UV-DAD, ES-MS	[38]
C <sub>18</sub> (25 cm–4.6 mm, 5 μm)	(A) 0.02 M ammonium acetate (B) Methanol (gradient elution – 20–100–20% B)	1/35	UV-DAD	[40]
Lichrospher 100 RP-18 (250–4 mm, 5 μm)	(A) Methanol (B) Triethylamine 5.00 mM and acetic acid 5.00 mM aqueous solution (pH 6.5), (45/55 (v/v))	0.3/19	UV-DAD	[41]
BDSHypersilC <sub>18</sub> (250–4.6 mm, 5 μm)	(A) Methanol (B) Tetrabutyl ammonium hydrogenosulfate (0.005 M, pH 3.5) (gradient 25% – 100% methanol)	0.8/16	UV-DAD	[45]
ODS-2 spherisorb phase Separations (250–4.6 mm, 5 μm)	(A) Water (B) Acetonitril 5 mM octylamine (pH 4.6) (gradient elution – 70:30 v/v A:B)	1/30	UV-vis	[46]

\*Sodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid.

*Fuente: Kucharska y Grabka (2010)*



**Tabla 5***Condiciones Cromatográficas Para la Detección de Amaranto y Ponceau 4R.*

Columna	Fase móvil	Elución - Volumen inyectado	Flujo - Temperatura en columna	Modo de ionización	Detector	Tiempo de retención	Autores
Ultimate XB-C18 (100x2.1 mm, 3.0 um)	Fase A: 20mM formiato de amonio 0.1% ac. Fórmico Fase B: metanol/acetoni- trilo 7/3	Gradiente  2 uL	0.3 mL/min  35 °C	ESI (negativo)	-	Amaranto: 5.13 min Ponceau: 8.68 min	(Feng et al., 2011)
Spherigel C18 (4.6mm x 250mm, 5 um)	Fase A: 20mM formiato de amonio 0.1% ac. fórmico Fase B: metanol	Gradiente  20 uL	1 mL/min  30 °C	ESI (negativo)	DAD	Ama: 5.23min Pon: 6.89min	(Ma et al., 2006)
C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 um)	A: agua que contiene 40 mM acetato de amonio con 2.5% de acetoni-trilo pH 7.8 B: acetoni-trilo	Isocrático  40 uL	0.4 mL/min  50 °C	ESI (negativo)	-	Ama: 3.23min  Pon: 5.4min	(Martin et al., 2016)
XDB-C18 (4.6x150 mm, 5um)	A: 20 mM buffer de acetato de amonio pH 7 B: metanol	Gradiente binario	1mL/min  40 °C	ESI	DAD	-	(Qi et al., 2015)
Sorbax C18 (150x2.1 mm, 3.5 um)	A: metanol B: 20mM acetato de amonio C: acetoni-trilo	Gradiente  5 uL	0.3 mL/min  35 °C	ESI (- +)	-	Ama: 4.65min Pon: 7.52min	(Gao et al., 2013)

#### **1.4.1. Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra es la primera etapa del análisis y consiste en la extracción de los colorantes de la muestra del alimento (Kucharska & Grabka, 2010), puede resultar difícil dado que depende del tipo de matriz y sustancias que el alimento contenga. En muchos casos esta etapa es más complicada que el análisis instrumental en sí.

Según Zhang et al. (2019), la miel es una muy matriz compleja que contiene más de 300 compuestos de diferentes familias químicas, como por ejemplos los azúcares y proteínas con gran peso molecular las cuales pueden interferir en el proceso, por lo cual se debe hacer un

tratamiento previo de extracción de estos compuestos para poder continuar con el análisis posterior.

#### ***1.4.2. La extracción en fase sólida (EFS)***

Se basa en la retención de analitos seleccionados en sorbentes, seguida de su elución con los disolventes apropiados. Combina los procedimientos de extracción y limpieza en un solo paso, proporcionando extractos limpios, que pueden ser analizados por cromatografía líquida. Atributos como sencillez, robustez, velocidad relativa y bajo consumo de disolvente son características que hacen de esta técnica una alternativa atractiva en el análisis de matrices complejas como las mieles (Souza Tette et al., 2016). La preparación de la muestra es una etapa fundamental del análisis, esta tiene gran influencia en la interpretación de resultados.

#### ***1.4.3. Sistema de detección***

Los detectores más usados en CLAE son el detector de arreglo de diodos (DAD) y el espectrómetro de masas. Al primero lo favorece su bajo costo y al segundo su mayor selectividad y bajos límites de detección. Muchos sistemas de CLAE contienen ambas posibilidades y se emplean con mucha frecuencia actualmente (Moldoveanu & David, 2017).

## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos y materiales**

Reactivos: Metanol y acetonitrilo grado HPLC, Ponceau 4R ( $\geq 99\%$ ), Amaranth ( $\geq 98\%$ ), ácido fórmico y formiato de amonio fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Agua tipo 1.

Cristalería: Vasos de precipitado, probetas, embudos con vástago, viales, pipetas Pasteur, tubos de ensayo y pesa sustancias de volumen o tamaño adecuado. Matraces aforados de 5 mL.

Otros: Pipetas automáticas de 1 mL y 0,1 mL, viales Eppendorf, algodón y papel de aluminio

## **2.2. Equipos de uso general**

Balanza analítica PA 224 (Ohaus): Determinación de la masa de muestras, patrones y reactivos.

Vortex (Fisher scientific): Asistió el proceso de disolución cuando fuese necesario.

Campana de extracción de gases: Todas las fases móviles y disoluciones se prepararon bajo su protección.

Sistema de purificación de agua Barnstead Smart2Pure (Thermo scientific): Usado en la obtención del agua tipo 1 (18,2 MΩ), empleada en la preparación de fases móviles y disoluciones acuosas.

## **2.3. Muestras de miel**

Cuatro muestras de miel de coloración roja (Miel 1-4) fueron suministradas por apicultores de la Ciudad de Machala entre enero de 2019 y octubre de 2020. Las muestras fueron almacenadas protegidas de la luz y a temperatura ambiente (25-30 °C). La localización de las muestras y los datos de los apicultores se conservan como información confidencial, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo. Una quinta muestra de miel (Miel 5), que no mostró coloración rojiza, fue incorporada al estudio para realizar comparaciones.

## **2.4. Extracción en fase sólida**

Un cartucho HyperSep C18 (Thermo Scientific) con 5g de fase estacionaria fue fijado con una pinza a un soporte universal y en el extremo inferior se le acopló una manguera de silicona (3 cm) con una pinza Hoffman para regular el flujo. Inicialmente, el cartucho fue acondicionado haciendo pasar a través de él 5 mL de metanol grado CLAE y posteriormente, con 5 mL de una disolución 0,1 % de formiato de amonio (m/v). 100 mg de miel se mezclaron

con 0,5 mL de la disolución anterior y se aplicaron en el extremo superior del cartucho con una pipeta Pasteur. El exceso de líquido sobre la superficie del cartucho se descartó a través de la salida inferior y posteriormente se hicieron pasar 10 mL de 0,1 % de formiato de amonio. El pigmento rojo retenido en la columna se eluyó pasando suficiente metanol grado CLAE, hasta colectarlo como una disolución roja en un tubo de ensayo. La disolución fue filtrada a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  directamente en un vial de CLAE.

## **2.5. Análisis CLAE-DAD**

El análisis CLAE se realizó con un equipo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) constituido por una bomba cuaternaria, un auto muestreador, el compartimento de la columna y un detector de arreglo de diodos. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna RP-18 Hypersil GOLD 150 x 4,6 mm (5  $\mu\text{m}$ ) a una temperatura de 35 °C. Las fases móviles empleadas fueron la mezcla metanol: acetonitrilo (7:3, v/v) (Fase A) y 20 mM de formiato de amonio en 0,1 % de ácido fórmico (solvente B). El gradiente empleado fue: 0-3 min, isocrático con 90 % B; 3-10 min, gradiente lineal de 90-50 % B y de 10-17 min recuperación de las condiciones iniciales. El sistema cromatográfico fue manipulado a través del programa Xcalibur 2.2. Se empleó un flujo de 2 mL/min y un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . La detección se realizó de forma simultánea a 216, 247, 333 y 510 nm. Los espectros UV-Vis fueron registrados en el rango de 200-600 nm.

## **2.6. Análisis cualitativo**

Inicialmente, se mezclaron 100 mg de miel con 1 mL de 0,1% formiato de amonio (m/v) preparado con agua tipo 1. Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  directamente en viales CLAE de vidrio transparente con capacidad para 2 mL.

Las muestras de mieles se compararon con el comportamiento cromatográfico de las disoluciones de los pigmentos Ponceau 4R (0,6 mg/mL) y Amaranto (0,7 mg/mL),

respectivamente. Como criterios para el análisis cualitativo se consideraron el tiempo de retención y el espectro UV-Visible.

## **2.7. Análisis cuantitativo**

Las muestras de mieles se prepararon de manera similar a lo descrito en el acápite anterior, pero se pesaron 2 g de cada muestra de miel y se diluyeron hasta 5 mL en un matraz aforado.

La cuantificación se realizó por el método del patrón externo empleando disoluciones de Ponceau 4R en el siguiente rango de concentraciones: 0,08-0,38 mg/mL. Se preparó una disolución madre (1mg/mL) disolviendo 5 mg del patrón con 0,1% formiato de amonio (m/v) hasta alcanzar un volumen de 5 mL en un matraz aforado, y partir de ella se obtuvieron las restantes concentraciones por dilución. Cada disolución se filtró directamente a los viales CLAE de la forma descrita anteriormente. La ecuación de la recta se obtuvo ploteando el área de los picos cromatográficos del patrón, deducidas a través del programa Xcalibur, con su respectiva concentración. Tanto las muestras de miel como las disoluciones del patrón se analizaron por duplicado. La regresión lineal se realizó con el programa Microsoft Excel y como criterio de ajuste de la recta a los valores experimentales se consideró el  $R^2$ .

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Resultados previos**

Inicialmente, el profesor Osmany Cuesta Rubio realizó experimentos preliminares con el objetivo de identificar algunas propiedades físicas y/o químicas del pigmento rojo presente en las muestras de mieles (resultados no publicados). Estos resultados se emplearon como información básica para el desarrollo de este trabajo de investigación. En particular, se dedujo que el compuesto mostraba una alta solubilidad en agua, absorción al visible por encima de los

500 nm y un comportamiento por espectrometría de masas similar a algunos pigmentos azoicos usados como colorantes en la industria de los alimentos.

### **3.2. Extracción en fase sólida**

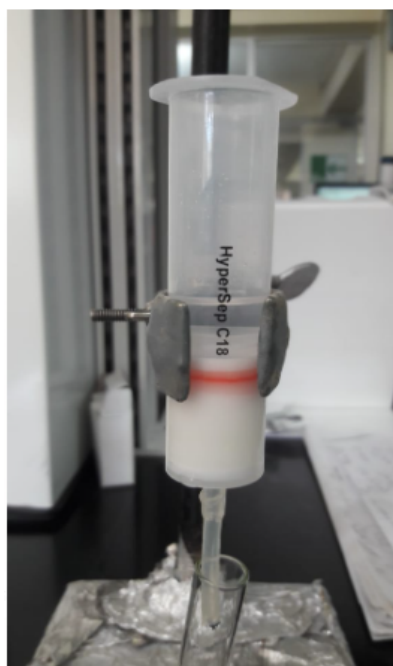
La extracción en fase en sólida (EFS) es un método ampliamente usado en el tratamiento de diferentes tipos de muestras (Souza Tette et al., 2016). Resulta útil para separar componentes presentes en matrices complejas, constituidas por una gran variedad de sustancias químicas, ya sea porque el compuesto de interés se queda retenido en la columna o porque eluya más rápido que el resto. Se ha empleado para separar y concentrar sustancias que se encuentran en pequeñas cantidades en muestras de mieles (Kamel, 2010; Maria de Souza Santos Cheibub et al., 2020; Souza Tette et al., 2016). Al tener en cuenta que los compuestos fundamentales de las mieles son los monosacáridos glucosa y fructosa, se practicó un método de EFS con el objetivo de separar el pigmento rojo de los carbohidratos.

Como razonamiento básico para aplicar la EFS se consideró la alta solubilidad de los carbohidratos en soluciones acuosas y, a la vez, su baja afinidad por los soportes de fase reversa (RP-18). Por tal motivo, se desarrolló un procedimiento donde el cartucho RP-18 fue eluido con una disolución de 0,1 % de formiato de amonio (m/v).

En la figura 2, se muestra la retención del pigmento rojo sobre la parte superior de la columna, después de eluirla con 10 mL de la disolución anterior. De esta forma, el pigmento rojo se pudo separar de forma adecuada de los carbohidratos que constituyen la muestra de análisis. El pigmento fue extraído fácilmente de la columna usando metanol como fase móvil. Se colectó la banda correspondiente en un tubo de ensayo y se conservó para ser analizada directamente por CLAE-DAD.

## **Figura 2**

*Cartucho Hypersep C18 con el Pigmento Rojo Retenido en la Parte Superior*



El proceso de EFS permitió obtener un eluato enriquecido con el pigmento y de esa forma se evitaría la entrada de azúcares a la fuente de ionización del espectrómetro de masas, ya que se pretendía realizar la detección por espectrometría de masas también. Sin embargo, algunas situaciones ajenas a nuestra voluntad no permitieron el uso de este sistema de detección y solo se realizó el estudio empleando el detector UV-Visible. Por tal motivo, solo se aplicó la EFS a una muestra de miel para corroborar así su posible uso futuro. Por otra parte, el comportamiento de la EFS permitió deducir que la fase móvil, para el análisis CLAE, debía comenzar con un alto contenido de agua y que una columna con una fase estacionaria similar a la del cartucho de EFS sería adecuada para el proceso de separación mediante cromatografía líquida.

El experimento de EFS demostró la mayor afinidad del pigmento por la fase estacionaria apolar con respecto a los monosacáridos, lo que es congruente con el

comportamiento de colorantes azoicos debido a la presencia de residuos aromáticos en sus estructuras.

### **3.3. Análisis CLAE-DAD**

#### ***3.3.1. Estudio cualitativo***

Al considerar la absorción del pigmento en la región visible del espectro electromagnético por encima de los 500 nm, zona donde no interfieren los carbohidratos, y la imposibilidad de realizar la detección por espectrometría de masas, se decidió realizar el análisis CLAE a las mieles sin previa EFS. Es decir, las muestras se diluyeron directamente con 0,1 % de formiato de amonio. De esta forma, se ahorraron los recursos materiales para estudios posteriores cuando sea posible emplear el sistema de detección por espectrometría de masas.

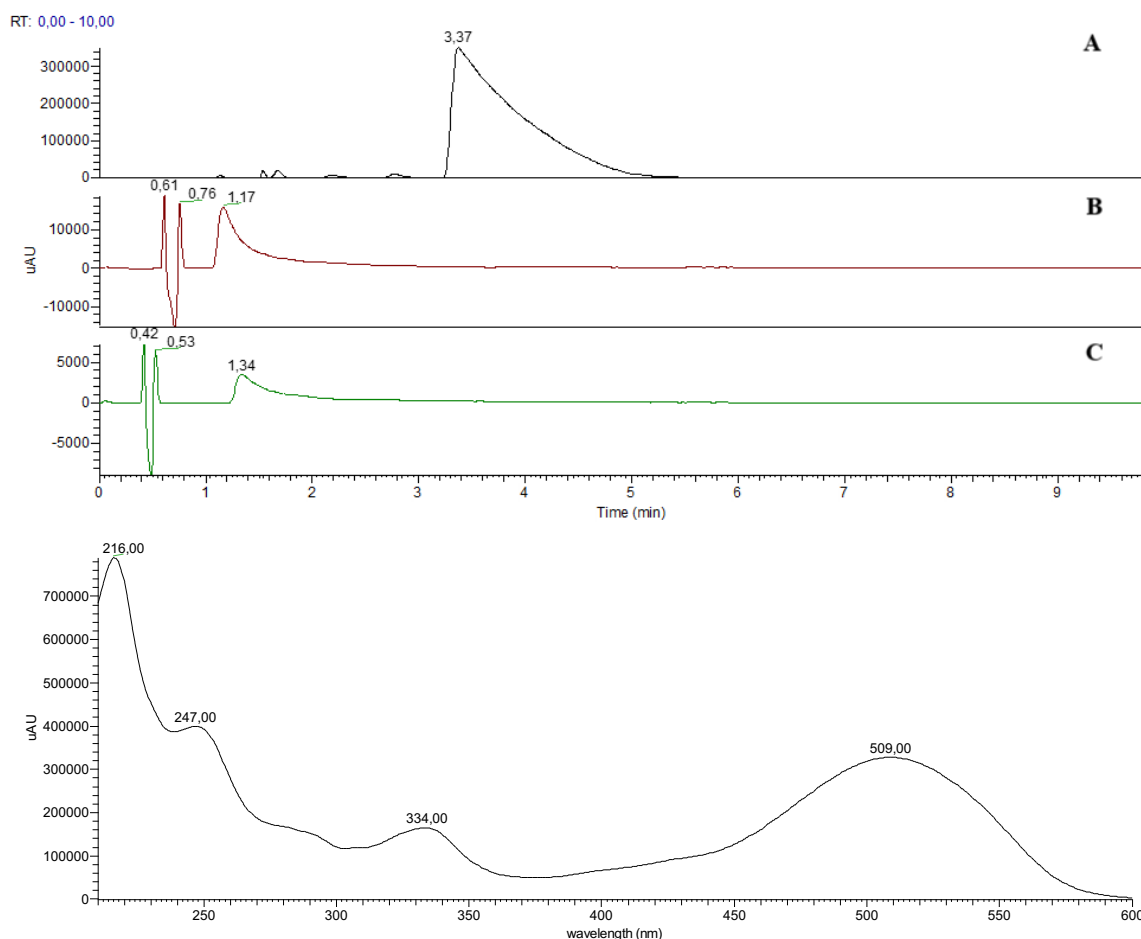
La comparación de diferentes sistemas cromatográficos empleados en el análisis de colorantes azoicos sugirió la selección de las condiciones cromatográficas para iniciar el estudio. Varios autores han demostrado la utilidad de columnas de fase reversa y fases móviles con el uso de dos modificadores orgánicos principales: ácido fórmico y formiato de amonio. Tanto el metanol como el acetonitrilo y sus mezclas se han usado como constituyentes de las fases móviles (Feng et al., 2011; Gao et al., 2013; Ma et al., 2006; Martin et al., 2016; Qi et al., 2015).

En las evaluaciones previas se empleó ácido fórmico como modificador, pero el comportamiento cromatográfico del pigmento aislado por EFS se caracterizó por picos extremadamente anchos y con asimetría posterior (Figura 3), que podrían solapar a otros compuestos y afectar los procesos de cuantificación. Aunque se probaron diferentes columnas y fases móviles, nunca se obtuvieron resultados satisfactorios al emplear ácido fórmico como modificador de la fase móvil.



**Figura 3**

*Cromatogramas del Pigmento Rojo Aislado de la Muestra de Miel*



*Cromatogramas del pigmento rojo aislado de la muestra de miel 1 con tres columnas de fase reversa y espectro UV-Vis en el rango 200-600 nm. A, B y C: Diferentes columnas de fase reversa (RP-18). Detección a 510 nm.*

La asimetría en picos cromatográficos es común en compuestos que pueden presentar equilibrios entre formas ionizadas y no ionizadas, ceto-enólicos, entre otros. En estos casos, los picos se tienden a ensanchar y producir asimetría anterior o posterior (Quattrocchi et al., 1992). Tanto el Amaranto como el Ponceau 4R son sales de ácidos sulfónicos y esta característica estructural podría ser la responsable de la forma del pico cromatográfico, ya que el pH del medio puede desplazar las sales y generar los grupos ácidos. El resultado observado, aunque

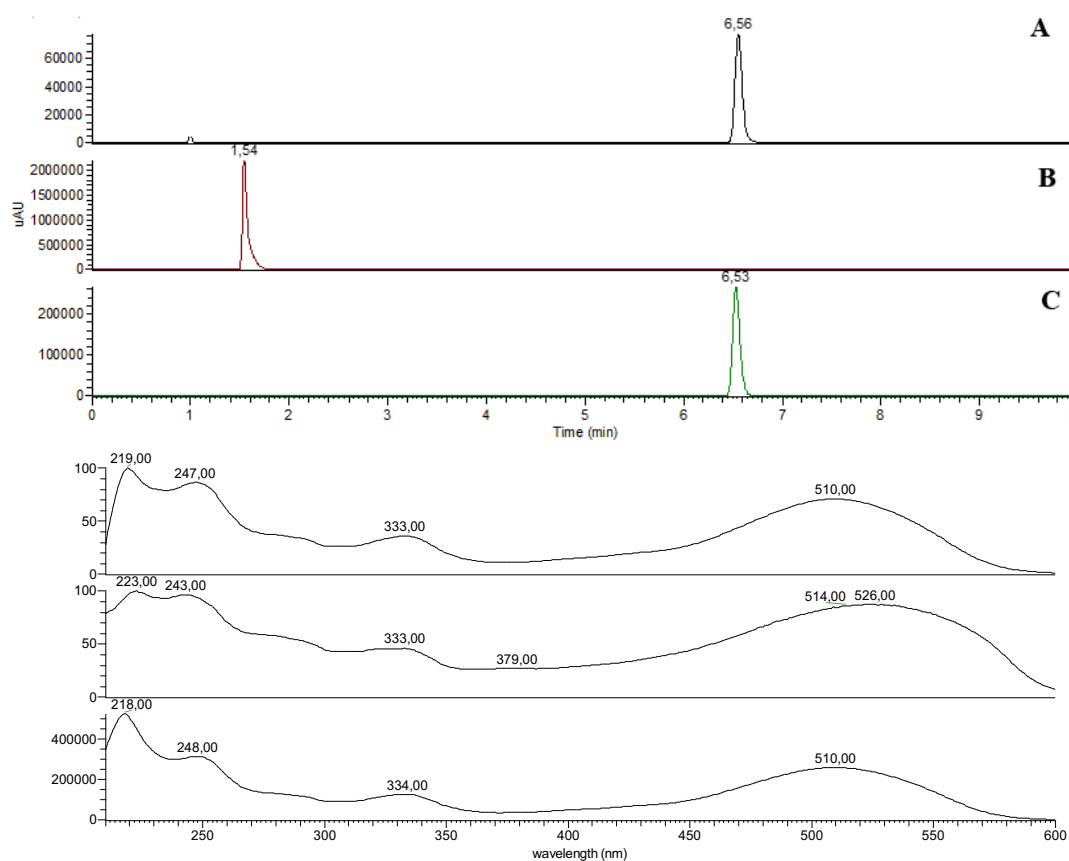
indeseado, constituye otra evidencia a favor de la presencia de colorantes azoicos en las muestras de miel de coloración roja.

El espectro UV del compuesto detectado a 510 nm se comparó con los reportados en la literatura para colorantes azoicos y se pudo constatar su similitud con la de los isómeros Ponceau 4R y Amaranto (Altinöz y Toptan, 2003; Fan et al., 2008; Floriano et al., 2018). Aunque el comportamiento cromatográfico fue inadecuado, el espectro UV también permitió corroborar los razonamientos iniciales y tomar decisiones oportunas para continuar el trabajo experimental.

En una segunda etapa se empleó el formiato de amonio como modificador orgánico, empleando condiciones similares a las reportadas previamente (Feng et al., 2011). De igual forma, se probaron varias condiciones cromatográficas hasta que se logró eliminar de manera apreciable la asimetría posterior del pico cromatográfico (Figura 4). De esta manera, se obtuvieron condiciones cromatográficas aceptables para la realización de estudios cualitativos y/o cuantitativos.

#### Figura 4

Cromatogramas a 510 nm del Pigmento de la Muestra Miel 1 (A), Patrones Amaranto (B) y Ponceau 4R (C). Espectros UV-Visible de los Tres Picos.



En la figura 4 se aprecia la correspondencia entre los cromatogramas del pigmento aislado por EFS (A) y los patrones Amaranto (B) y Ponceau 4R (C). Se aprecia coincidencia en cuanto al tiempo de retención del compuesto que absorbe a 510 nm y los espectros UV-Vis obtenidos en el rango 200-600 nm, en los cromatogramas A y C. Ambos resultados constituyen evidencias de la existencia del pigmento azoico en mieles rojas procedentes de Machala.

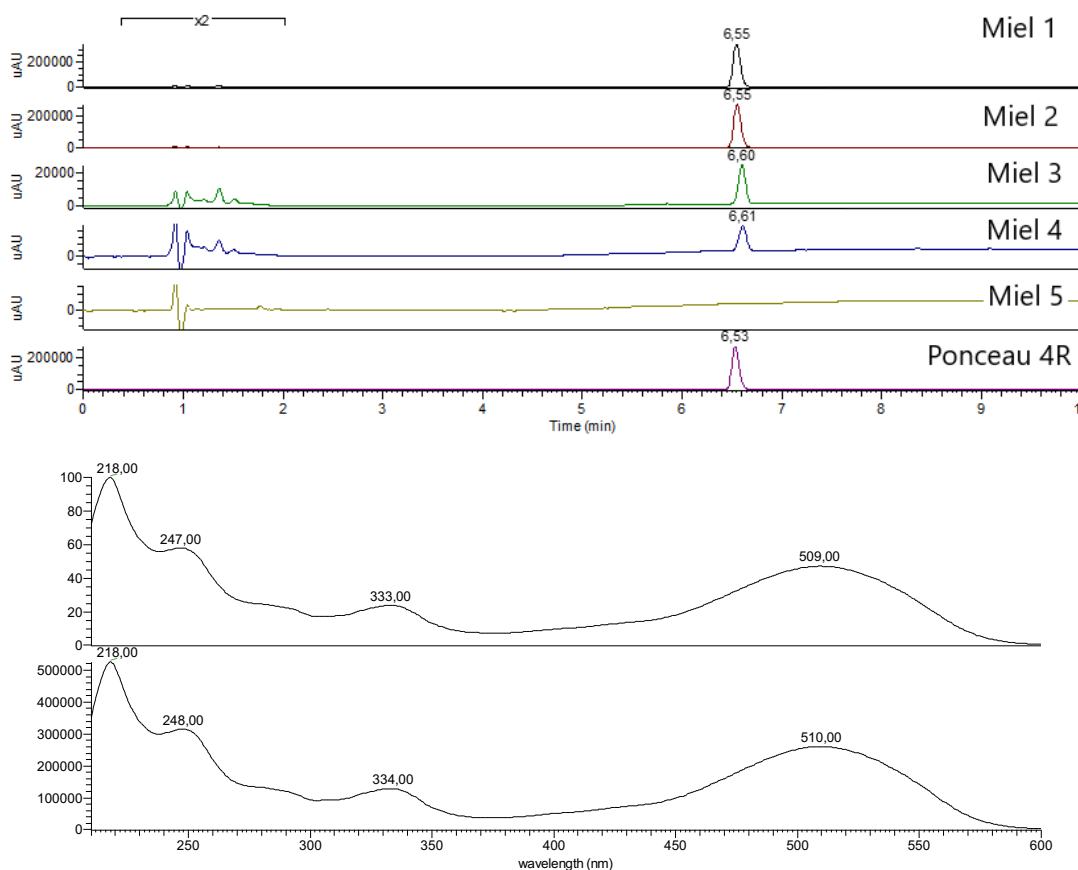
El pigmento Amaranto, aunque es un isómero de Ponceau 4R, mostró una amplia diferencia en cuanto al tiempo de retención y asimetría del pico, y muy ligeras diferencias en su espectro UV-Vis. Se descarta la posibilidad de que el Amaranto sea el responsable de la coloración roja de las mieles analizadas. Resulta interesante destacar las amplias diferencias,

en cuanto al comportamiento cromatográfico, de dos isómeros que comparten estructuras muy similares e incluso el mismo tipo y cantidad de grupos funcionales (Figura 1).

Al considerar los resultados anteriores, se decidió comparar el comportamiento de las muestras de mieles de coloración roja entre sí. Además, se incluyó una muestra (Miel 5) que no presentó coloración roja. Como se aprecia en la figura 5, todas las muestras de miel de coloración rojiza (Miel 1-4) mostraron un pico cromatográfico similar en cuanto a tiempo de retención y espectro UV, lo que sugiere un mismo compuesto causante de la coloración de las mieles objeto de estudio. Resulta interesante destacar la simplicidad del cromatograma, donde solo se aprecian otros picos de menor intensidad entre 1 y 2 min. La separación entre los picos detectados asegura una resolución óptima para realizar procesos de cuantificación. En la muestra Miel 5 no se detectó ningún pico cromatográfico en el tiempo de retención del patrón Ponceau 4R.

### Figura 5

Comparación de Cromatogramas a 510 nm de todas las muestras de mieles.



El estudio cualitativo realizado por CLAE-DAD permitió sugerir que la coloración roja de las mieles es producida por un pigmento artificial. Es conocido que las abejas pueden recolectar, además de néctar, otros materiales que emplean en la producción de miel en el caso de ser requerido (Alqarni et al., 2015; Cobo Ochoa, 2011; MacIvor & Moore, 2013). Todo parece indicar que las abejas recolectan algún producto azucarado que contiene el pigmento Ponceau 4R, quizás de un centro de elaboración de alimentos. Aunque las evidencias cromatográficas obtenidas constituyen un indicio importante de la naturaleza del pigmento, la confirmación por espectrometría de masas hubiese sido una prueba irrefutable sobre la identidad del mismo. Por lo tanto, queda pendiente la caracterización del pigmento a través de sus espectros  $MS^n$  y la respectiva comparación con el patrón Ponceau 4R.

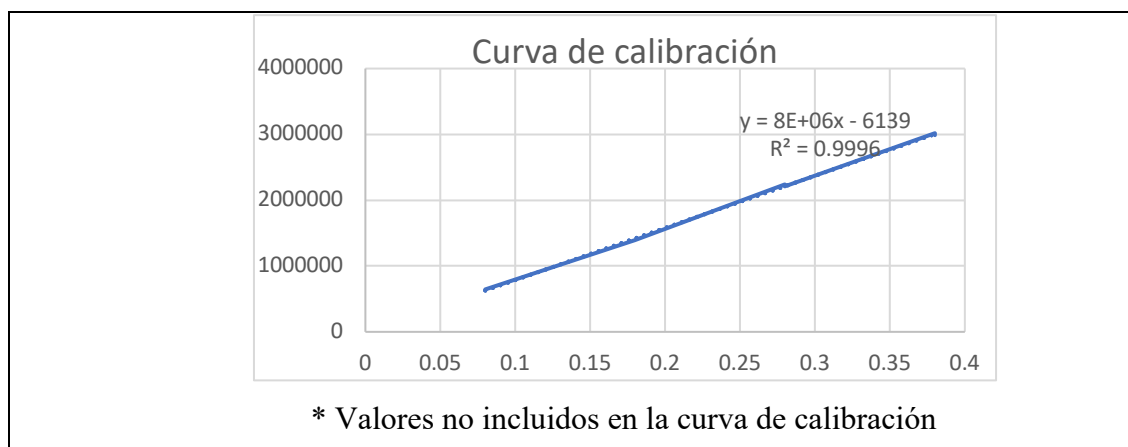
### 3.3.2. Estudio cuantitativo

La disponibilidad de Ponceau 4R permitió aplicar el método del patrón externo para cuantificar el pigmento presente en las muestras de mieles. Para tal efecto, se realizó el procedimiento habitual preparando disoluciones del patrón en el rango 0,08-0,38 mg/mL. Los resultados obtenidos con cuatro muestras de mieles se muestran en la tabla 6. En el caso de las muestras de miel se pesó 1 g en cada caso y se enrazaron a 5 mL en matraces aforados.

**Tabla 6**

*Resultados Obtenidos del Análisis Cuantitativo por CLAE-DAD*

<b>Muestra o patrón</b>	<b>Área del pico (Tr = 6,5 min)</b>	<b>Concentración (mg Ponceau 4R/g miel)</b>
Miel 1	1457413	0,182
Miel 1	1464734	0,183
Miel 2	1526468	0,191
Miel 2	1522045	0,191
Miel 3	115268	0,015
Miel 3	114244	0,015
Miel 4	29479	0,004
Miel 4	29003	0,004
0,02 mg/ml *	155920	-
0,04 mg/ml *	309235	-
0,08 mg/ml	640166	-
0,08 mg/ml	640985	-
0,18 mg/ml	1393463	-
0,18 mg/ml	1396019	-
0,28 mg/ml	2235033	-
0,28 mg/ml	2211425	-
0,38 mg/ml	3017852	-
0,38 mg/ml	2992240	-



A través de la ecuación de la recta se pudo deducir la concentración del pigmento en las muestras de mieles. Dos muestras (Miel 1 y Miel 2) mostraron concentraciones incluidas en el rango usado para construir la curva de calibración. Las muestras Miel 3 y Miel 4 exhibieron valores de áreas del pico cromatográfico inferiores al valor apreciado para la concentración menor incluida en la regresión lineal, por lo que los valores de concentración reportados para estas muestras no son concluyentes. En un intento por incluir los resultados de estas muestras en la curva, se exploraron dos concentraciones del patrón más bajas (0,02 y 0,04 mg/mL) pero ninguna de ellas resultó de utilidad. Los resultados obtenidos sugieren que las concentraciones del pigmento en las mieles objeto de estudio varían apreciablemente.

De manera general, se sugiere que para la construcción de las curvas de calibración se usen concentraciones que difieran en rangos regulares (Skog et al., 2014). En este caso, no fue posible cumplir esa regularidad para las cuatro muestras de miel y por tanto se sugiere la realización de dos curvas de calibración en estudios futuros. Otra posibilidad es aumentar la dilución de las muestras de miel con mayor cantidad de pigmento y usar una curva con rangos de concentraciones más bajos cuando se realice la cuantificación por espectrometría de masas, aprovechando los límites de detección más bajos que alcanza este detector. Las posibilidades limitadas de acceso al laboratorio, debido a la actual pandemia, y la inestabilidad de la

electricidad en el laboratorio, no permitieron la repetición de los análisis CLAE con nuevas curvas de calibración.

La comisión del Codex Alimentarius señala que el uso de aditivos alimentarios no está permitido en mieles (Comisión del Codex Alimentarius, 2019b). Por lo tanto, la presencia de este pigmento en las mieles de Machala podría constituir un impedimento para su uso y/o comercialización. Por otra parte, diferentes organismos reguladores establecen límites en cuanto al consumo de dichos pigmentos. La dosis máxima establecida por la JECFA en el Codex Alimentarius para el Ponceau 4R es 50 mg/kg de alimento y la ingesta diaria admisible (IDA) entre 0-4 mg/kg de peso (Comisión del Codex Alimentarius, 2019a). Tomando en cuenta los límites anteriores, la dosis máxima es ampliamente rebasada por las muestras Miel 1 y Miel 2, ya que ambas superan los 100 mg/kg. En cuanto a la IDA, si se considera que una persona habitualmente consume una cucharada de miel (15-20 g), la ingesta estaría cerca del valor límite y un consumo mayor a los 25 g superaría lo permitido; estas valoraciones se realizaron considerando las concentraciones del pigmento presente en las muestras Miel 1 y Miel 2.

#### **CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES**

La EFS es un método conveniente para separar el pigmento de las muestras de mieles rojas de los carbohidratos

El procedimiento CLAE-DAD implementado permitió sugerir que el pigmento causante del color de las mieles rojas de Machala es el Ponceau 4R.

#### **CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES**

Complementar el estudio CLAE-DAD con la detección por espectrometría de masas para la identificación inequívoca del pigmento.



## REFERENCIAS

- Al-Degs, Y. S. (2009). Determination of three dyes in commercial soft drinks using HPLC/GO and liquid chromatography. *Food Chemistry*, *117*(3), 485–490.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.097>
- Alqarni, A. S., Rushdi, A. I., Owayss, A. A., Raweh, H. S., El-Mubarak, A. H., & Simoneit, B. R. T. (2015). Organic tracers from asphalt in propolis produced by urban honey bees, *Apis mellifera* Linn. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128311>
- Altinöz, S., & Toptan, S. (2003). Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, *16*(4), 517–530. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00022-X)
- Alvarez-Suarez, J., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*, *3*(3), 420–432. <https://doi.org/10.3390/foods3030420>
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *73*(3), 914–922.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- Badui Dergal, S. (2013). *Química de los Alimentos*. Pearson.
- Bajkacz, S., & Kycia-Słocka, E. (2020). Liquid chromatographic in food analysis. In *Chemical Analysis of Food* (2nd Editio, pp. 391–455). Susan Dennis.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813266-1/00008-5>
- Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa, G., Adgaba, N., & Melaku, S. (2015). Botanical origin, colour, granulation, and sensory properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*, *167*, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.080>
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, *105*(2), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>
- Bonan, S., Fedrizzi, G., Menotta, S., & Elisabetta, C. (2013). Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dyes and Pigments*, *99*(1), 36–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.03.029>

- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science and Technology*, *45*(2), 284–295.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Chai, W., Wang, H., Zhang, Y., & Ding, G. (2016). Preparation of polydopamine-coated magnetic nanoparticles for dispersive solid-phase extraction of water-soluble synthetic colorants in beverage samples with HPLC analysis. *Talanta*, *149*, 13–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.026>
- Cobo Ochoa, A. (2011). Alimentacion de las abejas. Publicaciones de Extensiones Agrarias, 16. [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1977\\_22.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1977_22.pdf)
- Combeau, S., Chatelut, M., & Vittori, O. (2002). Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: Application to soft drinks. *Talanta*, *56*(1), 115–122.  
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00540-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00540-9)
- Comisión del Codex Alimentarius. (2015). *Nombres Genéricos y Sistemas Internacionales de Numeración de Aditivos Alimentarios CAC/GL 36-1989*.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2019a). *Norma General Para los Aditivos Alimentarios CODEX STAN 192-1995*.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2019b). *Norma para la Miel CXS 12-1987*.  
<https://doi.org/10.1037//0033-2909.126.1.78>
- de Almeida-Muradian, L. B., Stramm, K. M., & Estevinho, L. M. (2014). Efficiency of the FT-IR ATR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of Melipona subnitida honey and study of the temperature's effect on those properties. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(1), 188–195.  
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12297>
- Dinç, E., Baydan, E., Kanbur, M., & Onur, F. (2002). Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods. *Talanta*, *58*(3), 579–594. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00320-X)
- Duffus, J. H., Nordberg, M., & Templeton, D. M. (2007). Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition (IUPAC recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry*, *79*(7), 1153–1344. <https://doi.org/10.1351/pac200779071153>
- European Food Safety Authority. (2009a). Scientific Opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E 129) as a food additive. *EFSA Journal*, *7*(11), 1–39.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1327>

- European Food Safety Authority. (2009b). Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11).  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1332>
- European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on the re-evaluation of Erythrosine (E 127) as a food additive. *EFSA Journal*, 9(1).  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1854>
- European Food Safety Authority. (2013a). Refined exposure assessment for amaranth (E 123). *EFSA Journal*, 11(10), 1–18. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3442>
- European Food Safety Authority. (2013b). Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA Journal*, 11(4), 1–51.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3643>
- European Food Safety Authority. (2015a). Refined exposure assessment for Ponceau 4R (E 124). *EFSA Journal*, 13(4), 1–34. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4073>
- European Food Safety Authority. (2015b). Scientific Opinion on the re-evaluation of beetroot red (E 162) as a food additive. *EFSA Journal*, 13(12), 1–56.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4318>
- European Food Safety Authority. (2015c). Scientific Opinion on the re-evaluation of iron oxides and hydroxides (E 172) as food additives. *EFSA Journal*, 13(12), 1–57.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4317>
- European Food Safety Authority. (2015d). Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. *EFSA Journal*, 13(11).  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4288>
- Fan, L., Zhou, Y., Yang, W., Chen, G., & Yang, F. (2008). Electrochemical degradation of aqueous solution of Amaranth azo dye on ACF under potentiostatic model. *Dyes and Pigments*, 76(2), 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.09.013>
- Feng, F., Zhao, Y., Yong, W., Sun, L., Jiang, G., & Chu, X. (2011). Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(20), 1813–1818.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.04.014>
- Finola, M. S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, 100(4), 1649–1653.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.046>
- Floriano, L., Ribeiro, L. C., Saibt, N., Bandeira, N. M. G., Prestes, O. D., & Zanella, R.

- (2018). Determination of six synthetic dyes in sports drinks by dispersive solid-phase extraction and HPLC-UV-Vis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(3), 602–608. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170173>
- Food and Drug Administration. (2018). *Overview of Food Ingredients, Additives & Colors*. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>
- Gao, H., Yang, M., Wang, M., Zhao, Y., Cao, Y., & Chu, X. (2013). Determination of 30 synthetic food additives in soft drinks by HPLC/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 96(1), 110–115. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-046>
- González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á., & Heredia, F. J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2574–2580. <https://doi.org/10.1021/jf048207p>
- Huang, H. Y., Shih, Y. C., & Chen, Y. C. (2002). Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 959(1–2), 317–325. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00441-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00441-7)
- Kamel, A. (2010). Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5926–5931. <https://doi.org/10.1021/jf904120n>
- König, J. (2015). Food colour additives of synthetic origin. In *Colour Additives for Foods and Beverages* (pp. 36–60). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00002-7>
- Kucharska, M., & Grabka, J. (2010). A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80(3), 1045–1051. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.032>
- Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. (2018). Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In *Modern Techniques for Food Authentication*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x>
- Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., & Yao, S. (2006). Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103(1), 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.061>

- Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. de, Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composición y propiedades de la miel de *Apis mellifera*: una revisión. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5–37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
- MacIvor, J. S., & Moore, A. E. (2013). Bees collect polyurethane and polyethylene plastics as novel nest materials. *Ecosphere*, 4(12), 1–6. <https://doi.org/10.1890/ES13-00308.1>
- Maria de Souza Santos Cheibub, A., Silva Bahiense de Lyra, E., Jardim Alves, B., Andrade Donagemma, R., & Duarte Pereira Netto, A. (2020). Development and validation of a multipurpose and multicomponent method for the simultaneous determination of six synthetic dyes in different foodstuffs by HPLC-UV-DAD. *Food Chemistry*, 323(July 2019), 126811. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126811>
- Martin, F., Oberson, J., Meschiari, M., & Munari, C. (2016). Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC – MS in selected matrices. 197, 1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.067>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017). Basic Information Regarding the HPLC Techniques. In *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803684-6.00004-4>
- Ni, Y., Bai, J., & Jin, L. (1997). Multicomponent chemometric determination of colorant mixtures by voltammetry. *Analytical Letters*, 30(9), 1761–1777. <https://doi.org/10.1080/00032719708001692>
- Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Yamada, M., & Hiromasa, I. (1987). Simple Method for the Analysis of Food Dyes on Reversed-Phase Thin-Layer Plates. *Journal of Chromatography*, 1, 437–444.
- Oka, H., Ikaia, Y., Ohno, T., Kawamura, N., Hayakawa, J., Harada, K. ichi, & Suzuki, M. (1994). Identification of unlawful food dyes by thin-layer chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 674(1–2), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85235-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85235-9)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). *Miel*. 1.
- Özcan, M. M., & Ölmez, Ç. (2014). Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chemistry*, 163(April), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.072>
- Qi, P., Lin, Z. H., Chen, G. Y., Xiao, J., Liang, Z. A., Luo, L. N., Zhou, J., & Zhang, X. W. (2015). Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 181, 101–110.

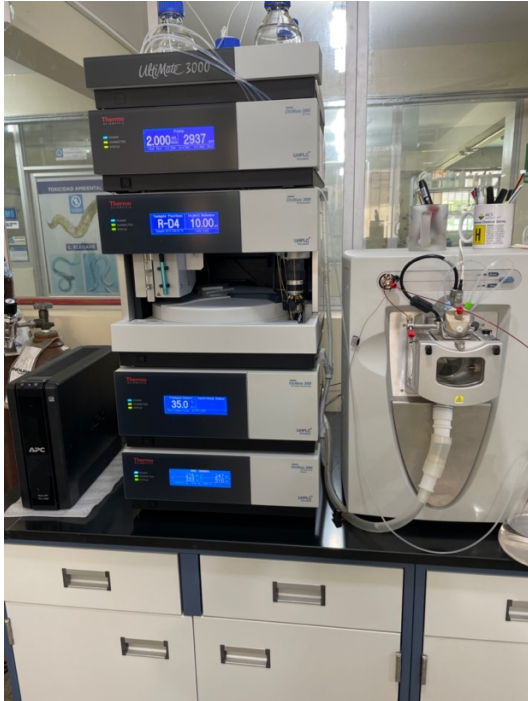
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.075>

- Quattrocchi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*. September 1992.
- Queiroz, A. J. D. M., Figueirêdo, R. M. F. De, Silva, C. L., & Mata, M. E. R. M. C. (2007). *Comportamento reológico de méis de florada de silvestre Rheological behavior of honey from Serjania glabrata flowers*. 83, 190–194.
- Ramesh, M., & Muthuraman, A. (2018). Flavorin and Coloring Agents: Health Risks and Potential Problems. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 1–30). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811518-3/00001-6>
- Rocío Sánchez, J. (2013). La Química del Color en los Alimentos. *Química Viva*, 12, 234–246.
- Różyło, R. (2020). Recent trends in methods used to obtain natural food colorants by freeze-drying. *Trends in Food Science and Technology*, 102, 39–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.005>
- Skog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentos de Química Analítica* (9na Edición). Cengage Learning.
- Souza Tette, P. A., Guidi, L. R., De Abreu Glória, M. B., & Fernandes, C. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>
- Tischer Seraglio, K. S., Silva, B., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., Carolina, A., & Costa, O. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International*, 119(January), 44–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.028>
- Vojdani, A., & Vojdani, C. (2015). Immune Reactivity to Food Coloring. *ALTERNATIVE THERAPIES*, 21(Suppl. 1), 48–58. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(06\)81353-5](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(06)81353-5)
- Zhang, Y., Li, X. Q., Li, H. M., Zhang, Q. H., Gao, Y., & Li, X. J. (2019). Antibiotic residues in honey: A review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 110, 344–356.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.015>

## ANEXOS

**Figura 5**

*Equipo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific)*



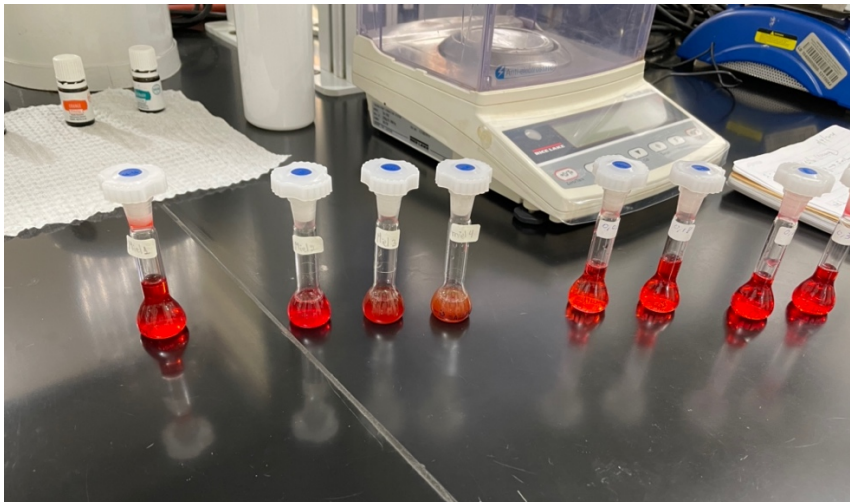
**Figura 6**

*Acondicionamiento del Cartucho Para la EFS*



**Figura 7**

*Diluciones de las Muestras de Miel y del Ponceau 4R*



**Figura 8**

*Obtención del Área Bajo la Curva Mediante el Software Xcalibur 2.2*

