



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Validación del método de cuantificación simultánea de conservantes y cafeína presentes en bebidas azucaradas por espectroscopía ultravioleta en la provincia de Tungurahua

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Segundo Javier Ojeda Armijos

Tutor: Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

Ambato - Ecuador

Marzo – 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 25 de enero del 2021

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

CI: 1802706596

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Segundo Javier Ojeda Armijos, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación la modalidad de Proyectos de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Segundo Javier Ojeda Armijos

CI: 0705075158

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Ing. Mg. Dolores del Rocío Robalino Martínez
C.I. 1801769488
Presidente del Tribunal

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria
CI: 1802142461

M. Sc. Jeanette Verónica Carrera Cevallos
CI: 1716192271

Ambato, 10 de marzo del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Segundo Javier Ojeda Armijos

CI: 0705075158

AUTOR

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico a mi madre María Armijos, quien durante todo este tiempo ha creído en mí, brindándome sus palabras de aliento cuando más las necesitaba, por enseñarme a luchar arduamente por las metas planteadas para poder lograrlas, por todo eso y mucho más, de todo corazón gracias madre por estar presente en mi vida.

A mi hermano Darwin Ojeda quien ha estado apoyándome durante todos estos años incondicionalmente y con el cual compartimos el mismo ideal de poder lograr obtener una carrera universitaria en la familia, querido hermano lo logramos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios por sus bendiciones, permitiéndome tener a mi familia a mi lado a pesar de los tiempos difíciles que pasamos actualmente, y también por permitirme poder terminar con mi carrera universitaria. A mi tutor Mg. Lander Pérez quien ha sabido inculcar sus enseñanzas durante la carrera universitaria, además de su guía en proyecto de vinculación con la sociedad y su apoyo en el trabajo de titulación.

A la señora Mari Carmen Celi, a don Ítalo Córdova y su familia y señora Narcisa Pérez y familia, quienes han demostrado que no se necesita tener parentescos para poder considerar a alguien como de la familia, a todos ellos por brindarme su amistad, consejos y apoyo incondicional, durante todo este tiempo, les estaré eternamente agradecido.

A mis amigos, quienes se convirtieron en una segunda familia de la carrera universitaria: Walter Torres, María José Hernández, Karina Zapata y Yesenia Pillapa quienes han estado durante todo este tiempo ayudándome con sus palabras de aliento, consejos y brindándome su amistad en los buenos y malos momentos.

A la Ing. Paola Rivera y familia por permitirme realizar las prácticas en su empresa LePlant donde se convirtió en una gran tutora y amiga, a la señorita Andrea Soto por su guía y amistad.

A don Álvaro Galarza y familia por su apoyo, permitiéndome tener un lugar donde trabajar y terminar mi carrera universitaria.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xviii
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Justificación.....	1
1.1.2 Validación del método.....	2
1.1.3 Método de adición de estándar	3
1.1.4 Cuantificación simultanea	4
1.1.5 Curva de calibración.....	4
1.1.6 Espectrofotometría	4
• Ley de Lambert-Beer	6
1.1.7 Verificación del Espectrofotómetro	7
1.1.8 Bebidas Azucaradas	8
1.1.9 Conservantes	9
• Ácido sórbico	9

• Ácido benzoico.....	10
1.1.10 Cafeína	12
1.1.11 Parámetros analíticos.....	13
a. Precisión	13
• Repetitividad	14
• Reproducibilidad	14
b. Exactitud.....	14
c. Rango lineal.....	14
d. Intervalo de trabajo.....	15
e. Sensibilidad	15
1.1.12 Incertidumbre.	15
• Incertidumbre tipo A	15
• Incertidumbre tipo B	16
• Incertidumbre combinada.....	16
• Incertidumbre expandida.....	16
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo general	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
1.3 Hipótesis	17
1.3.1 Uso del espectrofotómetro para la validación del método.	17

Hipótesis nula	17
Hipótesis alternativa	17
1.4. Señalamiento de variables de la Hipótesis	17
1.4.1. Variable dependiente	17
1.4.2. Variable independiente	18
CAPÍTULO II.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. Materiales	19
2.1.1. Material de análisis.....	19
2.1.1.1. Estándares para la determinar la presencia de conservantes y cafeína en bebidas azucaradas	19
2.1.1.2. Muestras de bebidas azucaradas gasificada y energizantes.....	19
2.1.2. Material de laboratorio	19
2.1.3. Equipos.....	21
2.1.4. Reactivos	21
2.2 Métodos	22
2.2.1 Lugar donde se analizaron las muestras	22
2.2.2 Parámetros analíticos de la validación	23
2.2.3 Diseño experimental.....	24
2.2.4 Verificación del Equipo Espectrofotométrico	25
2.2.5 Curvas de Calibración de ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína	27

2.2.6	Pretratamiento de bebidas azucaradas para su análisis.	29
2.2.6.1	Pretratamiento para eliminación de CO ₂	29
2.2.6.2	Tratamiento para determinación de ácido sórbico y ácido benzoico.	30
2.2.6.3	Tratamiento para determinación de cafeína	31
2.2.7	Método de adición de estándar	32
2.2.8	Parámetros analíticos para la validación del método	33
a.	Aplicación de Precisión	34
•	Factores utilizados para la repetitividad.....	34
•	Factores utilizados para la reproducibilidad	34
b.	Factores utilizados para la exactitud	35
c.	Factores utilizados para el rango lineal	35
d.	Factores utilizados para el intervalo de trabajo	37
•	Factores utilizados para el límite de detección (LOD).....	37
•	Factores utilizados para el límite de cuantificación (LOQ)	38
e.	Factores utilizados para la sensibilidad	38
2.2.9	Determinación de la concentración de analito presentes en las muestras	39
2.2.10	Determinación de la incertidumbre	39
CAPÍTULO III		42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		42
3.1	Verificación del Equipo Espectrofotométrico.	42

3.2 Curva de Calibración de ácido sórbico.....	45
3.3 Curva de Calibración de ácido benzoico.....	46
3.4 Curva de Calibración de cafeína.	47
3.5 Utilización de los parámetros analíticos para el análisis de los datos	48
a. Análisis de la precisión.....	48
• Repetitividad	48
• Reproducibilidad	51
b. Análisis de exactitud	54
c. Análisis del rango lineal	56
d. Análisis del intervalo de trabajo	58
e. Análisis de la sensibilidad	59
3.6 Resultados de la determinación del analito presentes en las muestras.....	62
3.7 Resultados de la Determinación de la incertidumbre	64
3.8 Comparación de los valores espectrofotométricos y cromatográficos.....	66
CAPÍTULO IV	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
4.1 Conclusiones	67
4.2 Recomendaciones	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Materiales utilizados para los análisis del proyecto.</i>	19
Tabla 2. <i>Equipos utilizados para los análisis del proyecto.</i>	21
Tabla 3. <i>Reactivos utilizados para los análisis del proyecto.</i>	21
Tabla 4. <i>Objetivos planteados de los parámetros analíticos.</i>	23
Tabla 5. <i>Detalles del diseño experimental.</i>	24
Tabla 6. <i>Criterios de verificación del equipo mediante el % T en el rango visible.</i>	42
Tabla 7. <i>Criterios de verificación del equipo mediante la Abs(%T) en el rango visible.</i>	43
Tabla 8. <i>Resultados del parámetro de longitud de onda de espectrofotómetro en rango ultravioleta.</i>	44
Tabla 9. <i>Resultados del parámetro control de absorbancia de espectrofotómetro en rango ultravioleta</i>	44
Tabla 10. <i>Resultados del parámetro control de la dispersión de la luz del espectrofotómetro en rango ultravioleta.</i>	45
Tabla 11. <i>Concentraciones usadas en la curva de calibración de ácido sórbico</i>	46
Tabla 12. <i>Concentraciones usadas en la curva de calibración de ácido benzoico</i>	47
Tabla 13. <i>Concentraciones usadas en la curva de calibración de cafeína</i>	48
Tabla 14. <i>Repetibilidad en muestras con 10 mg/mL, que contienen ácido sórbico.</i>	49

Tabla 15. <i>Repetibilidad en muestras con 10 mg/mL, que contienen ácido benzoico.</i>	49
Tabla 16. <i>Repetibilidad en muestras con 10 mg/mL, que contienen cafeína. ..</i>	50
Tabla 17. <i>Reproducibilidad con criterio de aceptación mediante prueba de Fisher y t-Student con muestras que contienen ácido sórbico con una concentración de 10 mg/mL.</i>	51
Tabla 18. <i>Reproducibilidad con criterio de aceptación mediante prueba de Fisher y t-Student con muestras que contienen ácido benzoico con una concentración de 10 mg/mL.</i>	52
Tabla 19. <i>Reproducibilidad con criterio de aceptación mediante prueba de Fisher y t-Student con muestras que contienen cafeína con una concentración de 10 mg/mL.</i>	53
Tabla 20. <i>Parámetros para determinar la presencia de ácido sórbico en las muestras mediante la exactitud.</i>	55
Tabla 21. <i>Parámetros para determinar la presencia de ácido benzoico en las muestras mediante la exactitud.</i>	55
Tabla 22. <i>Parámetros para determinar la presencia de cafeína en las muestras mediante la exactitud.</i>	56
Tabla 23. <i>Parámetros de linealidad obtenidos de las muestras con ácido sórbico.</i>	56
Tabla 24. <i>Parámetros de linealidad obtenidos de las muestras con ácido benzoico.</i>	57
Tabla 25. <i>Parámetros de linealidad obtenidos de las muestras con ácido benzoico.</i>	57
Tabla 26. <i>Determinación del LOD y LOQ mediante espectrofotometría en las muestras de ácido sórbico.</i>	58

Tabla 27. <i>Determinación del LOD y LOQ mediante espectrofotometría en las muestras de ácido benzoico.</i>	58
Tabla 28. <i>Determinación del LOD y LOQ mediante espectrofotometría en las muestras de cafeína.</i>	59
Tabla 29. <i>Sensibilidad de las pendientes en muestras que contienen ácido sórbico.</i>	59
Tabla 30. <i>Sensibilidad de las pendientes en muestras que contienen ácido benzoico.</i>	60
Tabla 31. <i>Sensibilidad de las pendientes en muestras que contienen cafeína.</i>	61
Tabla 32. <i>Concentración de ácido sórbico en las muestras.</i>	62
Tabla 33. <i>Concentración de ácido benzoico en las muestras.</i>	62
Tabla 34. <i>Concentración de cafeína en las muestras.</i>	63
Tabla 35. <i>Incertidumbre en las muestras con ácido sórbico.</i>	64
Tabla 36. <i>Incertidumbre en las muestras con ácido benzoico.</i>	65
Tabla 37. <i>Incertidumbre en las muestras con cafeína.</i>	65

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Longitud de onda en el rango ultravioleta	5
Figura 2. Esquema del funcionamiento del espectrofotómetro.....	7
Figura 3. Estructura del ácido sórbico.....	10
Figura 4. Estructura del ácido benzoico	11
Figura 5. Estructura de la cafeína.....	12
Figura 6. Ubicación de laboratorio LACONAL.....	23
Figura 7. Espectrofotómetro “Thermo Scientific EVOLUTION 60S” usado para determinar la absorbancia de las muestras de bebidas azucaradas. Equipo usado en laboratorio LACONAL.....	26
Figura 8. Kit de celdas “spectronic Standards 2 SN: SA0996 Calibration Data Summary” para calibración del espectrofotómetro en rango visible. Kit usado en laboratorio LACONAL.....	26
Figura 9. Celda de holmio, solución estándar de dicromato de potasio y solución estándar de cloruro de potasio para calibración del espectrofotómetro en el rango ultravioleta. Materiales usados en laboratorio LACONAL.....	27
Figura 10. Soluciones estándares con las concentraciones establecidas, para elaborar la curva de calibración de ácido sórbico y ácido benzoico. Materiales usados en LACONAL.....	28
Figura 11. Solución estándar de concentraciones de cafeína para la elaboración de la curva de calibración. Materiales usados en LACONAL.....	29
Figura 12. Pretratamiento de la muestra colocada en la plancha de calentamiento, para la eliminación del CO ₂ . Materiales y equipos usados en laboratorio LACONAL.....	30

Figura 13. Muestra sometida al tratamiento para la determinación de ácido sórbico y ácido benzoico. Materiales usados en LACONAL.	31
Figura 14. Muestra sometida al tratamiento para la determinación de cafeína. Materiales usados en LACONAL.	32
Figura 15. Balanza analítica usada para el pesado de los reactivos utilizados en el método de adición de estándar. Equipo usado en LACONAL.	33
Figura 16. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 3% T para el rango visible.	81
Figura 17. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 10 % T para el rango visible.	81
Figura 18. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 30 % T para el rango visible.	82
Figura 19. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 50 % T para el rango visible.	82
Figura 20. Datos obtenidos de transmitancia al usar celdas de holmio rango ultravioleta.	83
Figura 21. Datos obtenidos de transmitancia al usar soluciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con diferentes concentraciones, para rango ultravioleta.	83
Figura 22. Datos obtenidos de transmitancia al usar solución de cloruro de potasio (KCl), para el rango ultravioleta.	84

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibración de ácido sórbico	84
Gráfico 2. Curva de calibración de ácido sórbico	85
Gráfico 3. Curva de calibración de cafeína.	85
Gráfico 4. Pendientes en muestra de coca cola light con analito de ácido sórbico	86
Gráfico 5. Pendientes en muestra de coca cola light con analito de ácido benzoico.	86
Gráfico 6. Pendientes en muestra de coca cola light con analito de cafeína.....	87
Gráfico 7. Pendientes en muestra de 220V con analito de ácido sórbico.	87
Gráfico 8. Pendientes en muestra de 220V con analito de ácido benzoico.	88
Gráfico 9. Pendientes en muestra de 220V con analito de cafeína.	88
Gráfico 10. Pendientes en muestra de Monster con analito de ácido sórbico...89	
Gráfico 11. Pendientes en muestra de Monster con analito de ácido benzoico.	89
Gráfico 12. Pendientes en muestra de Monster con analito de cafeína.	90

RESUMEN

El ácido sórbico y ácido benzoico son usados como conservantes, con el fin de evitar la presencia de microorganismos en las bebidas azucaradas. En cambio, la cafeína actúa sobre el sistema nervioso, por lo cual se la usa como un estimulante. Sin embargo, el uso excesivo de conservantes y cafeína en las bebidas azucaradas puede ocasionar problemas de salud en los consumidores, por ello es importante conocer las concentraciones presentes en las muestras de Coca Cola Light, 220V y Monster, las cuales debe estar dentro de los valores establecidos por las normas NTE INEN-CODEX 192, INEN 1101 y INEN 2411. Se realizó la validación del método espectrofotométrico en el laboratorio LACONAL, utilizando el equipo 60S EVOLUTION, implementando el método de adición de estándar, elaboración de curvas de calibración y aplicación de parámetros analíticos como la precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, rango lineal, intervalo de trabajo y sensibilidad detallados en la guía Eurachem. Los parámetros analíticos tuvieron el criterio de aceptación, mediante la aplicación de la prueba de Fisher y t-Student, el porcentaje de Error absoluto, de Error relativo y de CV de Horwitz. Finalmente se aplicó la incertidumbre de: repetibilidad y reproducibilidad, la verificación del equipo espectrofotométrico, estos valores de incertidumbre permiten realizar el cálculo de incertidumbre combina, la cual es usada para obtener la incertidumbre expandida, donde el valor máximo fue de más menos 2,49 mg por ml. Se obtuvo un valor máximo del porcentaje de incertidumbre expandida de 5,77 por ciento, el cual es menor al 30 por ciento establecido.

Palabras clave: Química analítica, validación de métodos, métodos analíticos, gestión de calidad, aditivos alimentarios, cafeína, bebidas azucaradas.

ABSTRACT

Sorbic acid and benzoic acid are used as preservatives, in order to avoid the presence of microorganisms in sugary drinks. Instead, caffeine acts on the nervous system, which is why it is used as a stimulant. However, the excessive use of preservatives and caffeine in sugary drinks can cause health problems in consumers, so it is important to know the concentrations present in the samples of Coca Cola Light, 220V and Monster, which must be within the values established by the NTE INEN-CODEX 192, INEN 1101 and INEN 2411 standards. The validation of the spectrophotometric method was carried out in the LACONAL laboratory, using the 60S EVOLUTION equipment, implementing the standard addition method, preparation of calibration curves and application of analytical parameters such as precision, repeatability, reproducibility, accuracy, linear range, working range and sensitivity detailed in the Eurachem guide. The analytical parameters had the acceptance criteria, through the application of the Fisher and t-Student test, the percentage Absolute Error, the Relative Error and the Horwitz CV. Finally, the uncertainty of: repeatability and reproducibility, the verification of the spectrophotometric equipment, these uncertainty values allow the combined uncertainty calculation, which is used to obtain the expanded uncertainty where the maximum value was more less 2, 49 mg for ml. A maximum value of the percentage of expanded uncertainty of 5.77, was obtained, which is less than the established 30 percent.

Keywords: Analytical chemistry, method validation, analytical methods, quality management, food additives, caffeine, sugar-sweetened beverages.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Justificación

En la actualidad es de importancia aplicar la validación de un método, ya que nos permite determinar el desempeño adecuado del equipo y de la metodología aplicada, permitiendo tener un alto grado de confiabilidad de los datos obtenidos en el laboratorio **(Ruiz & Paizano, 2016)**. Según la guía "Eurachem" para la validación de un método, se utilizan parámetros analíticos **(Morillas et al., 2014)**. Los parámetros analíticos aplicados a los resultados de laboratorio permiten generar fiabilidad y aceptación de los resultados **(Cáñez & García, 2015)**. En Ecuador el consumo de las bebidas azucaradas, según ANFAB representan el 39 % del PIB nacional **(Valverde, 2018)**. La ENSANUT mediante sus encuestas determina que la población Ecuatoriana presenta un 22,2 % de obesidad y un 40,6 % de sobrepeso debido al consumo de bebidas azucaradas **(Segovia, 2016)**. Además los conservantes ácido sórbico (E200) y ácido benzoico (E210) al ser usados en exceso, pueden causar problemas de salud como cáncer, afecciones neuronales y cálculos renales **(Amaya, 2017)**. Mientras que el exceso de cafeína puede ocasionar problemas de salud como taquicardia, hipertensión y trastornos de comportamiento **(Cruz et al., 2020)**.

Los resultados obtenidos son parte del proyecto de investigación "Proyecto Política Tributaria y el consumo de bebidas azucaradas en el Ecuador" aprobado el 25 de julio de 2018 mediante la resolución del Honorable Consejo Universitario (HCU) número 1527-CU-P-2018, y prorrogado hasta el 31 de agosto de 2021, mediante la resolución de HCU número 0300-CU-P-2021, de fecha 20 de abril de 2021. En el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos "LACONAL" ubicado en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Se utilizó el espectrofotómetro 60S EVOLUTION utilizando el rango ultravioleta, para la cuantificación simultánea de ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína, usando el método de adición de estándar el cual nos permite eliminar el efecto matriz presentes en las muestras de bebida carbonatada y energizantes. En investigaciones previas la

validación del método mediante la cuantificación simultánea de conservantes ácido sórbico, ácido benzoico y de la cafeína en bebidas azucaradas, usando métodos cromatográficos como HPLC, como también métodos espectrofotométricos como el usado en la actual investigación. Permitiendo desarrollar un método rápido y de alta sensibilidad para la detección de analito como lo detalla (Aşçi et al., 2016). Otra investigación de validación de un método, permitió la determinación de las concentraciones de los conservantes presentes en las bebidas azucaradas, con el fin de validar el control de calidad de las bebidas (Mazdeh et al., 2016). Por lo que se denota la importancia de realizar la validación de un método, el cual permita la cuantificación de la concentración de conservantes y de la cafeína permitiendo saber el consumo máximo de la ingesta diaria presente en las bebidas azucaradas, con el fin de evitar el consumo en exceso, lo que pueden llegar a ocasionar problemas de salud en los consumidores. Mediante el uso del equipo espectrofotométrico se logró determinar la concentración de los conservantes y cafeína presentes en las muestras, dichas concentraciones están dentro de los valores establecidos por las normas INEN.

Estas investigaciones servirán como referencia para tomar los parámetros analíticos utilizados en el análisis, es habitual realizar la cuantificación simultánea usando el equipo cromatográfico HPLC, debido a la confiabilidad de los datos obtenidos, sin embargo, es un procedimiento costoso, por tal razón el equipo no puede ser adquirido por los laboratorios que realizan estos análisis. Por este motivo se busca realizar la validación de un método que tenga un menor costo económico, para ello se implementó el uso del equipo espectrofotométrico el cual nos permita mediante la absorbancia determinar la concentración de conservantes y cafeína en las muestras de bebidas azucaradas, con el fin de lograr el control de calidad.

1.1.2 Validación del método

La validación de un método permite determinar el desempeño adecuado tanto del equipo como de la metodología aplicada, para ello se hace uso de parámetros analíticos, los cuales son aplicados a los datos obtenidos de la absorbancia de las muestras analizadas, esto conlleva a tener un alto grado de confiabilidad de los datos de laboratorio (Ruiz & Paizano, 2016).

Mediante la validación de un método se obtiene los datos del análisis realizado en el laboratorio, estos deben ser veraces y confiables, para ello se aplica parámetros analíticos los cuales permiten tener un criterio de aceptación, con el fin de cumplir con estándares de calidad **(Socarras & Pretelt, 2020)**. Existen instituciones internacionales que han desarrollado guías como: Eurachem, ISO y GUM, las cuales cuentan con metodologías detalladas y los parámetros analíticos: selectividad, especificidad, exactitud, veracidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de trabajo, intervalo lineal e incertidumbre establecidos para la validación de un método. Cada análisis de las muestras presenta características específicas, por tal razón se debe aplicar la guía que mejor se adapten **(Ramos, 2014)**. En el Ecuador la encargada de la aplicación de parámetros analíticos utilizados en el laboratorio, es el Servicio de Acreditación Ecuatoriana “SAE” quien trabaja con las Norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2006, además mediante los ensayos físicos y químicos en alimentos, permite determinar la concentración permitida de un analito en los alimentos **(SAE, 2019)**. Hay diferentes tipos de métodos utilizados para la validación: métodos normalizados, los cuales están en normas nacionales e internacionales y son estandarizados; métodos no normalizados, los cuales son modificaciones de los estandarizados; métodos propios, los cuales son diseñados internamente en los laboratorios **(Quishpe, 2017)**.

1.1.3 Método de adición de estándar

El método de adición de estándar permite realizar una cuantificación de los analitos presentes en las muestras, agregando cantidades conocidas de analito en la muestra para posteriormente determinar la concentración del analito, el método de adición de estándar se lo aplica cuando la muestra no puede ser replicada por no conocer todos los componentes que la conforma a esto se le llama efecto matriz **(Gary, 2009)**. El efecto matriz presente en las muestra, puede ocasionar interferencias en las mediciones, por lo cual se deben agregar cantidades conocidas del analito para realizar una regresión lineal, para luego poder encontrar la concentración del analito presente en las muestras iniciales **(Espejo, 2016)**.

1.1.4 Cuantificación simultanea

Se realiza las mediciones de manera simultánea de más de un analito presente en la muestra, esto permite que se desarrolle el proceso de cuantificación de la concentración de los analitos en la muestra, de manera sencilla disminuyendo el costo al utilizar menos reactivos y el tiempo utilizados en las mediciones (**Cervantes, 2009**).

1.1.5 Curva de calibración

Mediante la curva de calibración se obtiene valores que están directamente relacionados, entre la señal dada por el equipo y la concentración del analito. En los análisis la curva de calibración se representa con una gráfica lineal la cual debe tener un valor del coeficiente de determinación ($r^2 > 0,995$), además se usa el valor de la pendiente “b” y del intercepto de la regresión lineal “a”, para ello se usa el cálculo de los mínimos cuadrados (**AGQ Labs Chile S.A, 2017**). La grafica de la curva de calibración es obtenida usando el equipo espectrofotométrico, donde las muestras son colocadas en el espectrofotómetro para determinar la absorbancia, ya que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, de esta forma mediante uso de la interpolación de la curva de calibración, se puede lograr obtener la concentración de analito presente en la muestra analizada (**Miller & Miller, 2002**).

1.1.6 Espectrofotetría

Consiste en la absorción de energía por parte de las moléculas las cuales están presentes en las muestras, donde el rango de longitud de onda de 190 nm a 400 nm se ubica en la región ultravioleta y de 400 nm a 700 nm en la región visible. Mediante la espectrofotetría se logra determinar la absorbancia presente en los analitos ya que estos absorben energía a una determinada longitud de onda (**Camelino et al., 2018**).

La estructura atómica de las moléculas determina cual es la longitud de onda que esta molécula puede absorber, dando paso a un salto de la energía basal llamado “E₁” a un estado de energía excitado conocido como “E₂”. Cada molécula presenta distintos estados de excitación propios de cada molécula (**Savina, 2017**). Para ello se emplea la constante de Planck “h” = $6,63 \times 10^{-34}$ Js; longitud de onda “λ”; velocidad de la luz “c” = 3×10^{10} cm.s⁻¹ utilizados en la siguiente formula:

$$E_1 - E_2 = hc\lambda$$

Existen diferentes tipos de energía las cuales provienen de la vibración y rotación de los electrones de las moléculas, estas energías interactúan con las radiaciones electromagnéticas lo que genera que existan diferentes longitudes de ondas. Donde cada longitud de onda e intensidad inciden de manera perpendicular sobre la sustancia interactuando con las moléculas presentes en la sustancia y de compuestos cromóforos los cuales absorberán una parte de la radiación incidente “ I_a ” dejando pasar la intensidad transmitida “ I_t ”, proveniente de la luz incidente “ I_o ” (Hereña & Melo, 2018). Donde se representa por la siguiente formula:

$$I_o = I_a + I_t$$

Además, la Transmitancia “ T ” está dada por la intensidad de la luz que logra atravesar la muestra “ I_t ” que llega al detector y la luz que incidió sobre la muestra “ I_o ” donde se ocupa la siguiente formula:

$$\% T = \left(\frac{I_t}{I_o} \right) * 100 \%$$

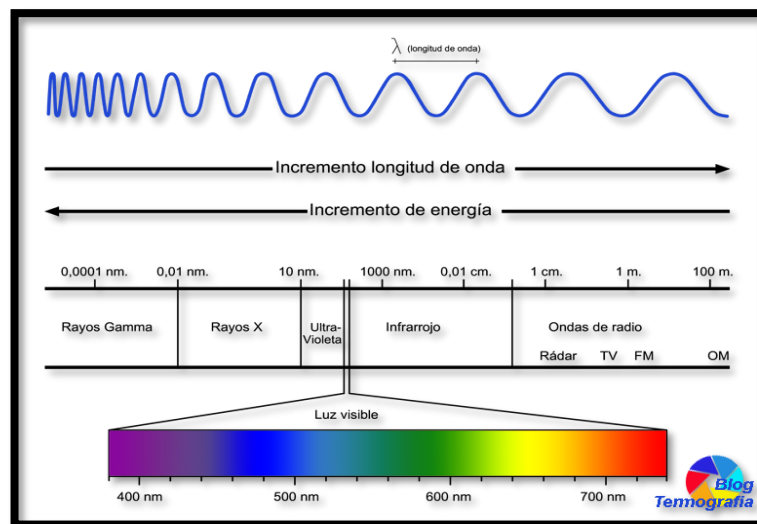


Figura 1. Longitud de onda en el rango ultravioleta (Meteoclim, 2016).

- **Ley de Lambert-Beer**

Esta ley es aplicada en la espectrofotometría, indicándonos que la absorbancia será atenuada cuando en la muestra analizada exista una concentración del analito y una distancia de recorrido de la luz. Estos factores influyen directamente en la intensidad, ya que el analito absorbe la luz logrando que se presente una atenuación de la intensidad (Fernández, 2016).

La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración (c) presente del analito en suspensión, también está presente el valor del coeficiente de absorción (ϵ), la distancia del trayecto óptico de la luz conocido como longitud (l), lo que da paso a la ecuación:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Esta técnica es versátil para poder encontrar la concentración de manera rápida y con un alto grado de proximidad (**Castaño, 2019**).

La ley de Lambert y Beer puede presentar errores al momento de realizar las mediciones, estos errores son de carácter:

- Químico los cuales están ligados al disolvente, impurezas y presencia de interferencias que se encuentran en la muestra.
- Instrumental, dado por malas lecturas de la muestra y la radiación parasitaria.
- Personal, dado por la mala manipulación de las cubetas usada en la muestra.

Por tal motivo es necesario implementar la verificación del equipo, lo que permite tener mediciones adecuadas, ya que el equipo tiende a descuadrarse con el paso del tiempo (**Fernández, 2016**).

El espectrofotómetro es un equipo que utiliza un haz de luz para la detección de la absorbancia, además contiene un espacio llamado porta celdas, la cual sirve para colocar las celdas que contienen la muestra, se considera un equipo con costos de análisis bajos ya que no requiere de reactivos adicionales para realizar las lecturas, en comparación con los equipos cromatografía los cuales usan diferentes tipos de gases

de altos costos, para poder realizar el funcionamiento de los inyectores que contienen las muestras **(Remache, 2013)**.

El espectrofotómetro está conformado internamente por una fuente de radiación provista por una lámpara de filamento de wolframio; un monocromador, que cumple la función de ajustar la longitud de onda; cubeta, fabricadas de vidrio, plástico o cuarzo de 1 cm de espesor, permite contener 2 mL de la muestra; señal eléctrica, convierte a la energía radiante mediante un detector en una señal de lectura. El conjunto de estos componentes nos permite que los datos sean presentados en la pantalla de visualización **(Hereña & Melo, 2018)**.

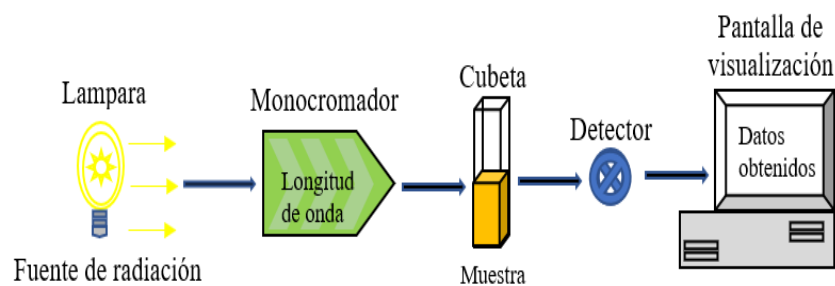


Figura 2. Esquema del funcionamiento del espectrofotómetro.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

1.1.7 Verificación del Espectrofotómetro

La verificación del equipo espectrofotométrico consiste en determinar si las lecturas dadas por el equipo son precisas, se usa kit de calibración, soluciones estándares específicas y celdas especiales. La verificación consiste en la determinación de 3 factores significativos los cuales son:

- Control de longitud de onda sirve para determinar el grado de concordancia entre la longitud de onda y la absorbancia obtenida.
- Control de la absorbancia permite la comparación de la señal obtenida con la de referencia.
- Límite de dispersión la cual sirve para determinar la dispersión de una serie de mediciones con la media de referencia **(Guzman & Rivera, 2020)**.

La verificación del equipo espectrofotométrico se lleva a cabo utilizando un kit de calibración y estándares con concentraciones establecidas:

- Celda especial de holmio.
- Soluciones de dicromato de potasio.
- solución de cloruro de potasio.

Todas los estándares deben ser evaluadas a una longitud de onda específica, para cada una de ellas lo que permite verificar el correcto funcionamiento del equipo espectrofotométrico, el criterio de aceptación para los valores obtenidos, están establecidos para cada uno de los estándares utilizando una longitud de onda específica **(Ruiz, 2014)**.

1.1.8 Bebidas Azucaradas

En Ecuador el consumo de bebidas azucaradas según Asociación Nacional de Fabricantes de Alimentos y Bebidas (ANFAB) representan el 39 % del PIB nacional, además genera una gran cantidad de empleos a nivel nacional, ya que existen 4.000 empresas en el país, estas empresas están en constante proceso de innovación para cumplir los estándares de calidad requeridos **(Valverde, 2018)**.

Las bebidas azucaradas pueden ser de tipo: naturales, artificiales, gasificadas, deportivas y energizantes, las cuales contienen aditivos: edulcorantes, conservantes, colorantes y cafeína **(Pou, 2019)**. La presencia de estos aditivos en las bebidas azucaradas requiere que se realice análisis de control de calidad, que permite determinar si cumplen con el límite establecido de la ingesta diaria. El consumo de estas bebidas azucaradas, al contener alto contenido de azúcares, provoca que los procesos fisiológicos inherente al almacenamiento de energía aumenten, esto conlleva a que el índice de masa corporal (IMC) y grasa corporal (GC) también lo hagan **(D. S. Cárdenas et al., 2019)**.

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2011-2013 (ENSANUT) realizó la primera investigación sobre la situación nutricional, mediante sus encuestas se determina que el 62,8 % de la población adulta mayor a 20 años presenta obesidad o algún grado de sobrepeso, mientras que en los datos unificados de la población ecuatoriana

demuestran que un 22,2 % de la población presenta obesidad y un 40,6 % sobrepeso debido al consumo de bebidas azucaradas (**Segovia, 2016**).

1.1.9 Conservantes

Son sustancias o mezclas distintas a la materia prima utilizada en la elaboración de un producto, las cuales son añadidas con el fin de ayudar al tratamiento y conservación de los productos para el envasado y posterior almacenamiento (**Villeda, 2010**). Los conservantes suelen ser compuestos químicos artificiales, los cuales actúan en los microorganismos impidiendo que estos utilicen las enzimas esenciales en el proceso metabólico, además estos compuestos pueden actuar sobre la membrana celular de los microorganismos evitando que estos se desarrollen. Los conservantes a pesar de ser unos excelentes antimicrobianos, también cumplen funciones como agentes antipardecimiento y ser unos poderosos antioxidantes (**Arias & Claro, 2006**).

A continuación, se nombra a los principales conservantes utilizados en las industrias alimentarias y farmacéuticas: ácido sórbico, ácido benzoico, ácido propiónico, ácido acético, ácido láctico, parabenos, sulfitos, nitritos, nitratos y antibióticos. Estos conservantes son utilizados en los productos con el fin de evitar procesos metabólicos desarrollados por los microorganismos como son: fermentación, putrefacción, acidificación y la presencia de mohos (**Vanegas & López, 2018**).

- **Ácido sórbico**

Los registros detallan que el ácido sórbico fue obtenido en el año de 1859 por A.W Hoffman, mediante un proceso de extracción de las bayas de azarollo. Pero tuvieron que pasar muchas décadas para que su estructura química sea determinada completamente en 1890, cabe recalcar que la extracción del ácido sórbico hasta ese entonces ese año era de manera natural. Una década después en 1900 mediante trabajos de laboratorios se logró la sinterización del ácido sórbico de manera sintética. En el año de 1940 después de realizar estudios microbiológicos se descubrió sus propiedades antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, ya que era capaz de afectar el desarrollo celular, generar alteración de la membrana celular y provocar cambios en el material genético de los microorganismos. El ácido sórbico y sus sales se caracterizan por ser solubles en agua, esto es de gran ayuda al agregarlo

en productos líquidos, por esta razón es de gran importancia comercial y sus aplicaciones son numerosas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Campos, 1995).

La fórmula del ácido sórbico es $C_6H_8O_2$, su nombre IUPAC es ácido trans-2,4-hexadienoico, tiene un peso molecular de 150,22 g/mol, otra característica interesante es que a pesar de tener doble enlace en su estructura es muy estable. Posee aplicaciones antifúngicas ya que puede destruir hongos y levaduras con una eficacia alta, en rangos de pH ácido desde 4 hasta 6, además se ha demostrado que pueden tener aplicaciones antibacterianas, en la industria se le asignado el número SIN E200 y se recomienda que su concentración en los productos no sobrepase el 0,10 % hasta 0,13 % (Arias & Claro, 2006).

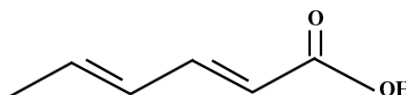


Figura 3. Estructura del ácido sórbico.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

En Europa el Comité Científico para la Alimentación Humana (SCF) se encarga de la regulación de los conservantes alimenticios entre ellos el ácido sórbico, el cual está avalado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Para su utilización en productos alimenticios, donde se recomienda que la ingesta diaria debe ser de 10 mg/Kg del peso de un adulto. El ácido sórbico se lo usa habitualmente como conservante en los productos por las empresas ya que tiene una baja toxicidad en los consumidores, a pesar de ello los estudios han demostrado que su uso en exceso y al ser consumido por los clientes, pueden causar problemas de salud como: diarrea y la presencia de cálculos renales (Morillo, 2016).

- **Ácido benzoico**

El ácido benzoico descubierto en el siglo XVI es un ácido carboxílico aromático, el cual era extraído de la resina de árboles del género *Styrax*, actualmente se lo obtiene

en el laboratorio de manera sintética mediante la oxidación de naftaleno de anhídrido Ftálico con óxido de vanadio y mediante hidrólisis de clorobenceno. El ácido benzoico es utilizado en la industria como un conservante, el cual ayuda a prevenir la contaminación de los productos alimenticios al momento de ser fabricados, ya que estos pueden contaminarse con la presencia de levaduras, bacterias y hongos (**Valdez et al., 2015**).

La fórmula del ácido benzoico es $C_7H_6O_2$, con peso molecular 122,12 g/mol, en la industria su uso es aprobado por la FDA, tiene asignado el número SIN E210 donde se lo detalla como conservante alimenticio, su acción está ligada sobre las bacterias y levaduras, en ambos microorganismos provoca daño a la pared celular lo que genera la lisis celular y destrucción de los microorganismos. Otra de sus aplicaciones están relacionadas a la inhibición de las actividades enzimáticas microbianas, evitando su proliferación en los productos (**Adarme & Rincones, 2008**).

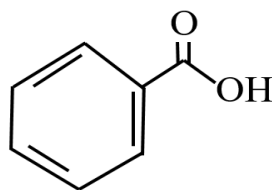


Figura 4. Estructura del ácido benzoico

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

En la industria en alimentos o bebidas las cuales presentan un pH ácido desde 2,5 hasta 4 suelen usar ácido benzoico en sus productos, debido a que este conservante suele trabajar y tener una acción inhibitoria frente a levaduras y bacterias. Sin embargo, debe ser usado en pequeñas cantidades, ya que provoca un sabor astringente el cual pasa desapercibido en los alimentos, pero en grandes cantidades suele generar un sabor agrio el cual compromete el sabor de los alimentos. La SCF lo describe con una toxicidad alta, por lo cual la ingesta diaria recomendada es de 5 mg/Kg por día, no debe ser consumido en exceso, ya que puede causar problemas de salud como: problemas neurológicos, tumores cancerígenos a largo plazo (**Cabana, 2020**).

1.1.10 Cafeína

La cafeína es descrita como un alcaloide, la cual fue aislada en el año de 1820 por Friederich Ferdinand Runge, mediante un proceso de extracción obtuvo un compuesto solido cristalino de color blanquecino. La cafeína también es conocida con el nombre 1,3,7 trimetilxantina (**E. G. González & Neira, 2014**). Es la industria alimenticia es usada en bebidas gaseosas y energizantes, debido a su acción sobre el sistema nervioso provocando una sensación de disminución de la fatiga esto avalado por estudios que demuestran que la cafeína es capaz de bloquear los receptores de adenosina. También puede tener una influencia directamente sobre las personas generando un aumento de la concentración debido al aumento extracelulares de los neurotransmisores noradrenalina y dopamina (**Romera, 2019**).

La fórmula de la cafeína es $C_8H_{10}N_4O_2$, su peso molecular 194,19 g/mol, La investigación para determinar su estructura fue llevada a cabo por el Químico Emil Fisher en el año de 1895. Una cualidad de la cafeína es su alta solubilidad donde 25mg por cada 1mL de líquido, debido a esta capacidad para homogenizarse con facilidad es utilizada en las bebidas sin ningún aditamento extra. En la industria alimenticia es usada en las bebidas energizantes, debido a sus aplicaciones estimulante sobre el sistema nervioso. Además sus aplicaciones se las encuentra en productos de belleza, ya que al entrar en contacto con la piel en conjunto con los productos cosméticos, favorece la acción de los componentes generando la lipólisis, acciones antioxidantes y reafirmantes (**Plá et al., 2017**).

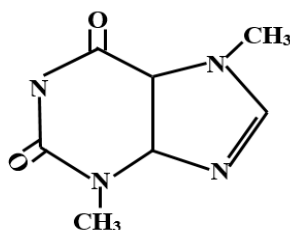


Figura 5. Estructura de la cafeína

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

El consumo de cafeína de acuerdo a la FAO no debe superar los 400 mg/L de cafeína/día, además se recalca que no debe mezclarse con alcohol, debido a que se presentan problemas de intoxicación graves, por tal razón no debe mezclarse bebidas energizantes con bebidas alcohólicas, ya que en altas dosis puede ocasionar problemas de salud como: agitación y palpitación cardiacas, hipertensión, convulsiones, trastornos psiquiátricos y neurológico, alteraciones del comportamiento (**Ravelo et al., 2012**).

1.1.11 Parámetros analíticos

De acuerdo a la guía Eurachem los parámetros analíticos utilizados en los datos de análisis de laboratorio, que deben ser tomadas en cuenta para la validación de un método habitualmente son: selectividad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), intervalo de trabajo, sensibilidad analítica, Veracidad (Sesgo y recuperación), Precisión (Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), incertidumbre de medida, Robustez todos estos parámetros analíticos son detallados en (**Morillas et al., 2014**).

Sin embargo, los parámetros analíticos que se utilizaremos para la “validación del método de cuantificación simultánea de conservantes y cafeína presentes en bebidas azucaradas por espectroscopía ultravioleta en la provincia de Tungurahua” la son los siguientes:

a. Precisión

Permite determinar si los resultados obtenidos del procedimiento de análisis analítico el cual se repite varias veces en diferentes días, para determinar la aceptación de los resultados de las mediciones, se usa el coeficiente de variación esto permite determinar si los resultados están en el rango establecido de aceptación. Cuando se realizan repeticiones usando el mismo operador, el mismo equipo y el mismo laboratorio se denomina a estas mediciones repetibilidad, mientras que las repeticiones cambiando el analista, el equipo o el laboratorio se llama reproducibilidad (**Camaró et al., 2014**).

- **Repetitividad**

Es usada para determinar si los datos obtenidos son semejantes usando el mismo equipo, el mismo laboratorio y el analista, pero las mediciones se lo hacen en un corto periodo de tiempo el cual puede ser de horas o días. Los valores de repetibilidad deben comprobarse si están dentro de un rango de aceptación, por lo cual se usa la ecuación de Horwitz, esta ecuación permite determinar el valor del porcentaje de covarianza (% CV) el cual depende de la concentración del analito de la muestra, este valor del % CV permite compararlo con el valor obtenido de las mediciones y lograr el criterio de aceptación. La repetibilidad busca encontrar la concordancia de las mediciones, donde las condiciones y la metodología sean las mismas (**Portuondo & Portuondo, 2010**).

- **Reproducibilidad**

Es usada para la determinación de la variación de las mediciones cuando hay diferentes analistas realizando las mediciones de las muestras, pero usando el mismo equipo, el mismo laboratorio y la misma muestra con la misma concentración de analito. La reproducibilidad se expresa de manera cuantitativa, para ello se hace uso de la dispersión de los valores de los resultados obtenidos, para su aceptación se hace uso de prueba de Fisher y t-Student (**González & Poveda, 2014**).

- b. Exactitud**

La exactitud se utiliza para el análisis del valor de referencia de absorbancia, frente a las mediciones por 6 repeticiones de las cuales se obtiene la media y desviación estándar, lo que permite tener el porcentaje de concordancia de la medición. Para lograr la aceptación de este parámetro analíticos se hace uso del cálculo del error absoluto y relativo en conjunto con una prueba t-Student. A la exactitud también se la conoce como veracidad (**Herrera, 2020**).

- c. Rango lineal**

Se utiliza con el fin de obtener resultados directamente proporcionales entre los valores de absorbancia y la concentración del analito presente en la muestra, este parámetro analítico para lograr su aceptación, debe tener un valor superior al coeficiente de determinación establecido el cual es de (r^2) 0,995 (**Castillo & González, 2015**).

d. Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo se usó para determinar el límite de determinación (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del analito que puede ser detectada por el equipo. Para ello se usa los valores de absorbancia obtenidos de las muestras que no contienen ninguna concentración del analito luego se procede a determinar: el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar experimental, estos valores serán implementados en las fórmulas establecida en la guía Eurachem para la determinación del LOD y LOQ (Loaiza, 2018).

e. Sensibilidad

Se compara las pendientes de las mediciones obtenidas en los diferentes días de sus mediciones, con el fin de comprar si el analito sufrió la interferencia por la presencia de impurezas. La sensibilidad es un parámetro analítico el cual consiste en comprar las pendientes de una gráfica observando la diferencia entre los valores de sus coeficientes de determinación (r^2), donde la aceptación estará dada mediante una prueba de Fisher (Hernández et al., 2015).

1.1.12 Incertidumbre.

Mediante el cálculo de la incertidumbre se puede determinar la dispersión de los datos en las mediciones obtenidas, la cuales pueden ser del mesurando, equipos, procedimientos, operadores y el ambiente, para ello se hace uso de los valores obtenidos de los parámetros analíticos de acuerdo a la guía GUM (GUM-JCGM, 2008). La guía GUM detalla la diferencia entre la incertidumbre de tipo A y la incertidumbre de tipo B, además de aplicar las reglas generales para para la evaluación de la incertidumbre detallada en la norma UNE-EN ISO 14253-1:1999 (J. J. Cárdenas et al., 2018; Pérez, 2012) Además, se hace uso de la norma INEN para la estimación de incertidumbre de resultado (CPE INEN-CODEX, 2014).

- **Incertidumbre tipo A**

Aplicada cuando existe mediciones de repeticiones de La muestra que contiene el analito de interés, las condiciones del análisis de las muestras deben mantenerse, utilizando el mismo equipo, el mismo operador y la misma concentración del analito.

La desviación de tipo A representada como U_1 , se obtiene al obtener el valor de la desviación estándar de todas las mediciones de repetibilidad realizadas, el valor de la desviación estándar es dividida por la raíz cuadrada del número total de mediciones (Torres, 2018).

- **Incertidumbre tipo B**

La incertidumbre tipo B consiste en analizar diferentes factores y está representada por U_2 y U_3 , donde el valor de U_2 se la obtiene de la desviación estándar provista por el fabricante del equipo el cual determina que existe una diferencia al realizar las mediciones de la absorbancia. Mientras que U_3 es la incertidumbre del observador, la cual se obtiene del promedio obtenido de la desviación estándar de los analistas que realizaron las mediciones, el valor promedio de la desviación estándar está dividido por la raíz cuadrada del número totales de las mediciones realizadas (Torres, 2018).

- **Incertidumbre combinada**

La incertidumbre combinada se representada por U_c , esta incertidumbre es el resultado de aplicar la raíz cuadrada de la suma de todas las incertidumbres U_1^2 , U_2^2 y U_3^2 elevadas al cuadrado, lo cual permite tener un valor de incertidumbre combinada del método (Eurachem/CITAC, 2012).

- **Incertidumbre expandida**

Esta incertidumbre la obtenemos al realizar la multiplicación de la incertidumbre combinada U_c por el factor de confianza identificado como “k” el cual representa el nivel de confianza que requerimos. Los valores de “k” varían de acuerdo al valor dado, cuando $k = 1$ tiene un valor de nivel de confianza del 68 %, $k = 2$ un nivel de confianza del 95 %, y para $k = 3$ con un nivel de confianza del 99 %. El valor de U sirve para poder determinar el % U (GUM-JCGM, 2008).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Validar el método de cuantificación simultánea de conservantes y cafeína presentes en bebidas azucaradas por espectroscopía ultravioleta en la provincia de Tungurahua.

1.2.2 Objetivos específicos

- Aplicar la metodología para la verificación del equipo espectrofotométrico, creación de curvas de calibración de E200, E210 y cafeína, pretratamiento de las muestras y uso del método de adición de estándar para su cuantificación mediante uso de Espectrofotometría ultravioleta.
- Aplicar los parámetros analíticos a los datos obtenidos de la cuantificación simultánea de conservantes y cafeína para determinar la validez del método.
- Analizar los datos obtenidos de los parámetros analíticos de la validación del método espectrofotométrico y compararlos con los resultados de incertidumbre del método cromatográfico para el control de calidad de bebidas azucaradas.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Uso del espectrofotómetro para la validación del método.

Hipótesis nula

Los valores de absorbancia obtenidos mediante el uso del espectrofotómetro, para determinar la concentración del ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína presentes en las bebidas azucaradas carbonatada y energizantes, empleando el método de adición de estándar no son significativos para el control de calidad.

Hipótesis alternativa

Los valores de absorbancia obtenidos mediante el uso del espectrofotómetro, para determinar la concentración del ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína presentes en las bebidas azucaradas carbonatada y energizantes, empleando el método de adición de estándar son significativos para el control de calidad.

1.4. Señalamiento de variables de la Hipótesis

1.4.1. Variable dependiente

Concentración de los conservantes y cafeína.

1.4.2. Variable independiente

Las bebidas azucaradas carbonatan y energizantes.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material de análisis

2.1.1.1. Estándares para la determinar la presencia de conservantes y cafeína en bebidas azucaradas

Reactivos grado analítico marca “Sigma-Aldrich”; ácido sórbico E200 ($C_6H_8O_2$); ácido benzoico E210 ($C_7H_6O_2$) y cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$).

2.1.1.2. Muestras de bebidas azucaradas gasificada y energizantes

Bebidas recolectadas en diferentes puntos de la provincia de Tungurahua: Coca Cola Light, 220V y Monster. Para el muestreo se utilizó las tendencias de consumo ya que son las más consumidas en la provincia de Tungurahua, debido a que las muestras tienen la característica estadística de ser muestras infinitas. Además estas bebidas azucaradas presentan en sus ingredientes los conservantes ácido sórbico, ácido benzoico y la cafeína (Guano, 2019).

2.1.2. Material de laboratorio

Tabla 1. *Materiales utilizados para los análisis del proyecto.*

Detalles	Cantidad
Balón de aforo de 10 ml	10
Balón de aforo de 100 ml	10
Puntas de micropipeta	5

Micropipeta de 100 μ L	1
Vaso de precipitación de 500 mL	5
Vaso de precipitación de 100 mL	5
Matraz de 500 mL	5
Embudo de vidrio	1
Embudo de separación de 250 mL	1
Probetas 100 mL	6
Pipeta 10 mL	2
Pipeta de 5 mL	4
Celdas de cuarzo de 2 mL	2
Papel aluminio	1
Papel filtro	1
Varillas de agitación	2
Papel de pH MACHEREY	1

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

2.1.3. Equipos

Tabla 2. *Equipos utilizados para los análisis del proyecto.*

Detalles	Cantidad
Espectrofotómetro Thermo Scientific EVOLUTION 60S UV-Vis	1
Calentador eléctrico	1
Balanza analítica “Boeco Germany”	1

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

2.1.4. Reactivos

Tabla 3. *Reactivos utilizados para los análisis del proyecto.*

Detalle	Cantidad
Agua destilada	7.570 mL
Ácido benzoico E210 (C ₇ H ₆ O ₂)	2 g
Ácido clorhídrico 1M (HCl)	12 mL
Ácido sórbico E200 (C ₆ H ₈ O ₂)	2 g
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄)	15 mL
Cafeína (C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂)	2 g

Cloruro de potasio (KCl)	1g
Cloruro de sodio (NaCl)	60 g
Cloroformo (CHCl ₃)	360 mL
Dicromato de potasio (H ₂ Cr ₂ O ₇)	1 g
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂	500 mL
Hidróxido de amonio (NH ₄ OH)	2 mL
Hidróxido de sodio (NaOH)	2,5 g
Sulfito de sodio anhidrido (Na ₂ SO ₃)	5 g
Sulfocianuro de potasio (KCNS)	5 g

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

2.2 Métodos

2.2.1 Lugar donde se analizaron las muestras

La muestra de bebida azucarada carbonatada Coca Cola Light y las bebidas energizantes 220V y Monster utilizadas para la validación del método de determinación de la concentración de ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína, fueron tomadas de diferentes lugares de la provincia de Tungurahua.

El lugar donde se realizó las mediciones y posterior análisis de los parámetros analíticos, fue el laboratorio LACONAL ubicado en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, el cual cuenta con acreditación SAE Norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2006.



Figura 6. Ubicación de laboratorio LACONAL

Fuente: Google Maps, (2022).

2.2.2 Parámetros analíticos de la validación

Tabla 4. *Objetivos planteados para los parámetros analíticos.*

Parámetros	Objetivos
Repetibilidad	<p>Los valores obtenidos deben $\leq \% CV_{\text{Horwitz}}$</p> <p>Los valores de la prueba de Fisher calculada deben ser menores a los valores críticos de Fisher.</p>
Reproducibilidad	<p>Los valores de las pruebas de Fisher y t-Student calculada deben ser menores a los valores críticos de Fisher y t-Student.</p>

Exactitud	% de concordancia de medición % CM debe estar entre el 80 % – 110 %
	% Error Absoluto ≤ 5 %
	% Error relativo ≤ 5 %
Rango lineal	Regresión lineal donde el coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,995$
Intervalo de trabajo	LOD ≤ 3 mg/mL
	LOQ ≤ 5 mg/mL
Sensibilidad del método	Regresión lineal donde el coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,995$ Los valores de la prueba de Fisher calculada deben ser menores a los valores críticos de Fisher.
Incertidumbre	Los valores de % U ≤ 30 %

2.2.3 Diseño experimental

Tabla 5. *Detalles del diseño experimental.*

Repetibilidad	Se realizará 10 repeticiones realizadas en 3 días diferentes
Reproducibilidad	Se usará 6 mediciones en 2 días diferentes, usando 2 analistas diferentes

Exactitud	Se usarán 6 mediciones las cuales se compararán con un valor de referencia para poder obtener el valor del porcentaje de concordancia de medición % CM
Rango lineal	Se realizará 3 curvas de calibración, realizadas en 3 días diferentes las cuales servirán para poder obtener una curva promedio y obtener el coeficiente de determinación de la regresión lineal
Intervalo de trabajo	Se realiza 6 mediciones del blanco, cada una de estas mediciones realizadas por triplicado de la muestra pretratada, la cual sirve para poder determinar el valor de LOD y LOQ
Sensibilidad del método	Se realizará una comparación de las curvas de calibración en una misma gráfica y se aplicó una prueba de Fisher.
Incertidumbre	Se determino la incertidumbre tipo A, incertidumbre tipo B, incertidumbre combinada, incertidumbre expandida y el porcentaje de la incertidumbre expandida.

2.2.4 Verificación del Equipo Espectrofotométrico

Se realizó la verificación del equipo espectrofotométrico marca “Thermo Scientific EVOLUTION 60S” con el fin de comprobar que el equipo tiene la capacidad de poder determinar la absorbancia. Las muestras que contienen los analitos de interés presentan una absorbancia la cual debe ser semejante al medirse varias veces, esto permite determinar la exactitud fotométrica (**Scientific, 2009**).



Figura 7. Espectrofotómetro “Thermo Scientific EVOLUTION 60S” usado para determinar la absorbancia de las muestras de bebidas azucaradas. Equipo usado en laboratorio LACONAL.

Se utilizó el kit de calibración marca “Spectronic Standards 2 SN: SA0996 Calibración Data Summary” para equipo espectrofotométrico, el kit contiene celdas especiales de vidrio montado en bastidores metálicos de 3, 10, 30 y 50 % de Transmitancia (T) (Thermo Scientific, 2015).



Figura 8. Kit de celdas “spectronic Standards 2 SN: SA0996 Calibration Data Summary” para calibración del espectrofotómetro en rango visible. Kit usado en laboratorio LACONAL.

En el mismo sentido que la verificación del equipo espectrofotométrico, también se utilizó 3 factores para la verificación del espectrofotómetro los cuales son: el control de longitud de onda, el control de la absorbancia y el límite de dispersión (Guzman & Rivera, 2020). El control de longitud de onda permitió realizar la verificación, utilizando una celda especial de holmio, en la cual se agregó 2 mL del blanco la cual se llevó a la determinación de la absorbancia con rango de longitud de onda de 241,15 nm y de 536,30 nm.

El control de absorbancia se usó una celda de cuarzo, además de 2 soluciones estándar de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), donde la solución estándar A tienen una concentración de 600,6 mg/L la cual se elaboró con 10 mL de H_2SO_4 al 0,01 N y 6,006 mg de $K_2Cr_2O_7$, se colocó 2mL de la solución estándar A en la celda de cuarzo y se evaluó la absorbancia a una longitud de onda de 430 nm. Mientras que la solución estándar B con una concentración de 60,06 mg/L se elaboró 10 mL de H_2SO_4 al 0,01 N y 0,6006 mg de $K_2Cr_2O_7$, de esta solución estándar B se colocó 2 mL en la celda de cuarzo y se evaluó con un rango de longitud onda de 235 nm hasta 350 nm.

El tercer factor de verificación fue el límite de dispersión de luz, se usó una solución estándar de cloruro de potasio KCl con una concentración de 12 g/L la cual se elaboró con 0,120 g KCl y 10 mL de agua destilada, se colocó 2 mL del estándar en una celda de cuarzo y se evaluó con una longitud de onda de 190 nm (Ruiz, 2014).



Figura 9. Celda de holmio, solución estándar de dicromato de potasio y solución estándar de cloruro de potasio para calibración del espectrofotómetro. Materiales usados en laboratorio LACONAL.

2.2.5 Curvas de Calibración de ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína

La curva de calibración del ácido sórbico se realizó determinando la absorbancia de 9 estándares con diferentes concentraciones 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 25 mg y el blanco, cada una de estas concentraciones disueltas en 100 mL de agua bidestilada. Se colocó 2 mL de la muestra inicial la cual contiene 1 mg de ácido sórbico en la celda de cuarzo, y se obtuvo la absorbancia en el rango ultravioleta con una longitud onda de 260 nm, el proceso se repitió con cada una de las concentraciones descritas.

La curva de calibración para el ácido benzoico se obtuvo realizando la absorbancia de 9 estándares con diferentes concentraciones 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 25 mg y el blanco, cada una de estas concentraciones disueltas y aforado con agua bidestilada en un balón de aforo de volumen de 100 mL, se colocó 2 mL de la muestra inicial la cual contenía 1 mg de ácido benzoico en una celda de cuarzo, para determinar la absorbancia en el espectro ultravioleta con una longitud de onda de 230 nm (**Danchana et al., 2021**).



Figura 10. Soluciones estándares con las concentraciones establecidas, para elaborar la curva de calibración de ácido sórbico y ácido benzoico. Materiales usados en LACONAL

La curva de calibración de cafeína se realizó con 9 concentraciones diferentes 1; 2; 3; 5; 10; 12; 16; 20; 25 mg y el blanco, las concentraciones se diluyeron y se aforaron con cloroformo en balones de aforo de volumen de 10 ml, la muestra inicial de 1 mg se colocó en una celda de cuarzo, para determinar la absorbancia en el rango ultravioleta con una longitud de onda en 276 nm (**INEN, 2013**).

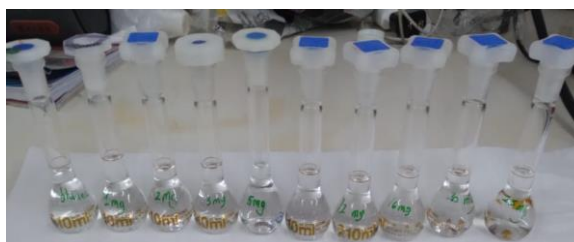


Figura 11. Solución estándar de concentraciones de cafeína para la elaboración de la curva de calibración. Materiales usados en LACONAL.

Los valores registrados de la absorbancia se realizaron por triplicado para cada concentración, al realizar estas mediciones por triplicado existirán valores los cuales están cerca entre ellos, pero también existen valores los cuales no se encuentran dentro de los rangos esperados. Por lo tanto estos valores pueden ocasionar un cambio significativo al momento de obtener el promedio que se utiliza para realizar la curva de calibración, por tal motivo se hace uso del test de Grubbs el cual nos permite identificar valores atípicos de las mediciones (Díaz, 2015). El test de Grubbs utiliza la siguiente fórmula:

$$G_{\text{máx}} = \frac{\text{máx}[y_i - \bar{y}]}{s} = G_{\text{cal}} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s}$$

Donde:

x_i = medición realiza

\bar{x} = promedio de las mediciones realizadas

s = desviación estándar

n = número de repeticiones realizadas

G_{cal} = valor calculado mediante la formula

$G_{\text{crítico}}$ = valor obtenido de tabla con un $\alpha = 0,05 \%$ y el valor de “n” con el cual se obtiene un valor de 1,1543.

2.2.6 Pretratamiento de bebidas azucaradas para su análisis.

2.2.6.1 Pretratamiento para eliminación de CO₂.

Las bebidas azucaradas gasificadas y energizantes necesitan tener un pretratamiento, para poder eliminar la presencia de CO₂ que contiene debido a que la presencia de burbujas podría ocasionar interferencia al realizar las mediciones de absorbancia mediante espectrofotometría, la absorbancia es utilizada para la determinación de la concentración de conservantes y cafeína presentes en estas bebidas. El pretratamiento

consistió que mediante la implementación de calor y agitación se eliminara la presencia de CO₂, para ello se utilizó un vaso de precipitación de volumen de 500 mL, en el cual se colocó 300 mL de la muestra, luego se colocó el vaso sobre una plancha de calentamiento hasta llegar al punto de ebullición durante un periodo de tiempo de 15 minutos con agitación constante. Una vez culminado el tiempo de ebullición, se procedió a realizar una filtración usando un embudo y el papel filtro, el pretratamiento se aplicó a las 3 bebidas Coca Cola Light, 220V y Monster (Azuma et al., 2020).



Figura 12. Pretratamiento de la muestra colocada en la plancha de calentamiento, para la eliminación del CO₂. Materiales y equipos usados en laboratorio LACONAL.

2.2.6.2 Tratamiento para determinación de ácido sórbico y ácido benzoico.

Se utilizó como base el tratamiento dispuesto en la Norma técnica NMX-F-309-S-1978 para la determinación de ácido benzoico y ácido sórbico, esta norma es muy similar a las normas INEN 1 089. Se utilizó 10 mL de muestra desgasificada la cual se agregó en un embudo de decantación con un volumen de 250 mL, posteriormente se agregó 10 mL de solución saturada de NaCl (elaborada con 30 g de NaCl y 150 mL de agua destilada), 5 mL HCl 1:1000 (elaborada con 1,4 mL de HCl 1M y 138,6 mL de agua destilada), 5 mL de NH₄OH al 0,1 % (la cual se elaboró con 10 mL NH₄OH 3M y aforado a 1000 mL con agua destilada).

Se agito para lograr la eliminación de componentes presentes en la muestra dejando solo la presencia de los conservantes de interés, luego se realizó un lavado agregando 20 mL de éter, se agita para lograr que entren en contacto la muestra con el éter, luego de cada agitación se abre la llave para eliminar los excesos de gas que desprende la

muestra al ser agitado en conjunto con el éter. Se dejó reposar por unos minutos, lo cual permite que las dos fases acuosa y etérea se separen para realizar la extracción, la fase acuosa es utilizada en la adición de estándar, mientras que la fase etérea es recolectada para su posterior eliminación. Cabe mencionar que este tratamiento de las muestras es aplicable para las muestras que serán utilizadas para determinar la presencia de los dos conservantes ácido sórbico y benzoico (Asistencia et al., 1978).



Figura 13. Muestra sometida al tratamiento para la determinación de ácido sórbico y ácido benzoico. Materiales usados en LACONAL.

2.2.6.3 Tratamiento para determinación de cafeína

La determinación de cafeína se realizó utilizando 10 mL de muestra pretratada desgasificada, se colocó en un embudo de separación de volumen de 250 mL, donde se agregó 5 mL de solución de permanganato de potasio (KMnO_4) al 1,5 % (elaborado con 0,750 g de KMnO_4 y 50 mL de agua destilada), se dejó reposar por 5 minutos donde la muestra se torna de un color lila intenso, posteriormente se agregó 10 mL solución reductora (elaborada con 5 g de sulfito de sodio anhidrido (Na_2SO_3) y 5 g de sulfocianuro de potasio (KCNS) disueltos en 100 mL de agua destilada), 1 mL de solución de ácido fosfórico (elaborada con 3 mL de ácido fosfórico y 14 mL de agua destilada), 1 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) (elaborada con 5 g NaOH y 15 mL de agua destilada).

Se realizó una homogenización de la mezcla mediante agitaciones repetidas, se agregó 20 mL de cloroformo (CHCl_3) realizando agitación para que entre en contacto con la muestra y abriendo la llave del embudo con el fin de eliminar la presencia de gas que se generó al realizar la agitación, se dejó reposar por unos minutos esperando que se formen las dos fases acuosa y la del cloroformo, retiró el cloroformo el cual se presentó

en la parte baja del embudo, la fase acuosa es recuperada mediante filtración utilizando un matraz y un embudo de vidrio con papel filtro (INEN, 2013).



Figura 14. Muestra sometida al tratamiento para la determinación de cafeína. Materiales usados en LACONAL.

2.2.7 Método de adición de estándar

Se realizó la configuración del espectrofotómetro UV-Vis 60S EVOLUTION, en la opción curva de calibración del panel de control del equipo, se aplicó la configuración: longitud de onda a 260 nm utilizado para ácido sórbico, unidades de concentración se seleccionó mg/mL, cantidad de muestras a determinar 6 estándares, modelo de medición se utilizó el de 1 celda, luego se guardó la configuración y se realizó el registro de las concentraciones utilizadas de los estándares de 2; 3; 5; 7; 9; 10 mg los cuales nos darán sus respectivas absorbancias en el espectrofotómetro.

El blanco consistió en 10 mL de la muestra, a la cual se le realizó previamente el pretratamiento de eliminación de CO₂ y el tratamiento para obtener la concentración de ácido sórbico. El blanco no contiene ninguna concentración del ácido sórbico, se agregó 2 mL de la muestra en la celda de cuarzo y se llevó a medición en el espectrofotómetro para obtener la absorbancia. Luego se agregó al blanco 2 mg ácido sórbico se homogenizó, siendo este el primer estándar de 2 mg/mL, del cual se colocó 2 mL en la celda de cuarzo, para poder obtener la absorbancia de esta concentración. Posteriormente se agregó 1 mg de ácido sórbico, al estándar de 2 mg/mL, para tener una concentración total de 3 mg/mL se homogenizó y se coloca en la celda de cuarzo, cabe recalcar que después de cada medición la celda debe ser lavada con la muestra

inicial con el objetivo eliminar residuos de los estándares anteriores. Estos pasos se repitieron hasta la medición del estándar final de 10 mg/mL.

La configuración de los parámetros del espectrofotómetro varía la longitud de onda donde: para el ácido benzoico es de 230 nm, para el ácido sórbico 260 nm y para la cafeína de 276 nm. todos los demás pasos descritos previamente para la configuración del espectrofotómetros, así como la elaboración del blanco como de las concentraciones de los estándares es igual al ya descrito para el ácido sórbico (**J. R. Rodríguez et al., 2011**).



Figura 15. Balanza analítica usada para el pesado de los reactivos utilizados en el método de adición de estándar. Equipo usado en LACONAL.

Luego de que se realizó la lectura de los 6 estándares para obtener las absorbancias, se elaboró la línea de regresión del método de adición de estándar, la concentración de los conservantes y de la cafeína presentes en las muestras se obtuvo al realizar la extrapolación y determinar donde corta la pendiente en el eje de (- x), este método se implementó debido a que las muestras presentaban el efecto matriz el cual se presenta cuando la muestra que se va analizar, no se puede replicar por desconocimiento de todos los componentes que la conforman (**Espejo, 2016**).

2.2.8 Parámetros analíticos para la validación del método

Los resultados que se obtuvieron de la determinación de las muestras de bebidas azucaradas mediante el método de adición de estándar para la determinación de la cafeína y los conservantes ácido sórbico y ácido benzoico usando el espectrofotómetro de marca “Thermo Scientific EVOLUTION 60S” con longitudes de onda ultravioleta las cuales van desde los 260 nm hasta los 760 nm. Se utilizó los parámetros analíticos

como la precisión el cual está dado por la repetibilidad y la reproducibilidad, la exactitud, rango lineal, intervalo de trabajo y sensibilidad, los cuales son descritos en la guía “Eurachem” necesarios para la validación de un método analítico.

a. Aplicación de Precisión

La precisión del método se basa en la concordancia de los resultados obtenidos de los ensayos realizados, la precisión está conformado por la repetibilidad y la reproducibilidad (**Maroto, 2002**). La repetibilidad y reproducibilidad se obtienen al analizar diferentes factores que suelen influir en los datos obtenidos, dichos factores son: el laboratorio implementado en los análisis, el equipo utilizado, los reactivos, el analista encargado de realizar los ensayos y los diferentes días en que se realiza los análisis (**INEN-ISO 5725-3, 2014**). En la validación del método se usó la precisión donde se implementó periodos cortos de tiempo dado en días diferentes para obtener valores de repetibilidad y distintos analistas para la reproducibilidad.

- **Factores utilizados para la repetitividad**

Las mediciones de repetibilidad se realizó en diferentes días, usando la concentración final del método de adición estándar de 10 mg/mL, para determinar si los valores obtenidos tienen concordancia entre sí, se aplicó la ecuación de Horwitz para laboratorios de ensayos, la cual consiste en obtener el porcentaje de coeficiente de variación (CV %), el cual nos establece un CV% de acuerdo a la cantidad de analito disuelto en la muestra, en base a esos datos se debe obtener un valor $\leq 5,6$ CV% de esta manera las mediciones podrán ser aceptadas o rechazadas (**Rivera & Rodriguez, 2010**).

- **Factores utilizados para la reproducibilidad**

La reproducibilidad se realizó haciendo mediciones en diferentes días y con diferentes analistas, de esta manera mediante 6 repeticiones de la muestra con una concentración de 10 mg/mL, mediante análisis de varianza de un factor se busca encontrar el valor de F_{cal} y el valor de $F_{crítico}$, donde el valor de $F_{crítico} > F_{cal}$ se acepta que existe una buena disposición de reproducibilidad de las muestras (**Torres, 2018**).

b. Factores utilizados para la exactitud

La exactitud nos permite trabajar con el valor de la $Ab_{S_{prevista}}$ la cual es comparada con la $Ab_{S_{obtenida}}$, usando estos dos valores nos permitió determinar el valor del % de concordancia de medición (% CM) los cuales deben estar dentro del 80 % al 110 % de acuerdo al criterio de aceptación descrito por la AOAC, esto se detalla en **(Lòpez & Murillo, 2017)**. Para ello se hizo uso de la formula:

$$\%CM = \left(\frac{Ab_{S_{obtenida}}}{Ab_{S_{prevista}}} \right) * 100$$

La incertidumbre se obtuvo al obtener el valor absoluto del % CM restado del promedio % CM de todas las mediciones, de esta forma se obtiene valores positivos, mediante la siguiente formula.

$$Incertidumbre = | \% CM - \bar{x}_{\%CM} |$$

El error absoluto se obtuvo al obtener el promedio de las mediciones de la incertidumbre donde los valores que se obtuvieron serán $\pm 1,00$ o el valor que se consiga, el cual es añadido al valor de % CM, mientras que el error relativo es el resultado de la división de promedio %CM y el error absoluto, donde él % representa cuan efectivo es la medición realizada donde valores $\leq 5\%$ se consideran aceptables.

$$Error\ relativo = \frac{error\ absoluto}{\bar{x}_{\%CM}}$$

c. Factores utilizados para el rango lineal

La linealidad es la representación mediante un gráfico entre la relación que presenta la concentración del analito y la absorbancia obtenida, mediante mediciones por triplicado de concentraciones conocidas de 2; 3; 5; 7; 9; 10 mg/mL, se obtiene el promedio de los valores de absorbancia los cuales servirán para realizar la curva de calibración **(Marroquín, 2015)**.

Fórmula para hallar b:

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Fórmula para hallar a:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Ecuación para obtener la absorbancia

$$y = bx + a$$

Formula del coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

Formula de coeficiente de determinación

$$r^2$$

Donde:

y = la Absorbancia obtenida

x = concentración mg/mL

m = pendiente de la curva de calibración = b

a = intercepto con el eje y cuando x=0

r = coeficiente de correlación

r² = coeficiente de determinación

d. Factores utilizados para el intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo es la determinación de la capacidad del equipo de medir la concentración del analito presente en las muestras de acuerdo a la Norma NP- ISO/ IEC 17025:2018 establecida en (ONA, 2019). para ello se realizó mediciones sucesivas del blanco el cual no contiene ninguna concentración del analito, los valores obtenidos del blanco por triplicado se sometieron a cálculos donde se determinó el promedio, la desviación estándar esta se usó para la determinación de la desviación estándar experimental usada para calcular el LOD y LOQ como lo establece la guía Eurachem (Morillas et al., 2014).

Fórmula para la obtención de la desviación estándar

$$s_o = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Fórmula para la obtención de la desviación estándar experimental

$$s_o' = \frac{s_o}{\sqrt{n}}$$

Donde:

\bar{x} = Promedio de las mediciones del blanco

n = el número de mediciones realizadas

s_o = Desviación estándar

s_o' = Desviación estándar experimental

- **Factores utilizados para el límite de detección (LOD)**

Mediante las mediciones por triplicado del blanco, se obtuvo los valores de s_o' el mismo que es utilizado para la determinación del LOD, para el cual se aplica la formula, que permitió obtener la concentración más baja de analito determinada por el método analítico (S. G. Rodríguez, 2019).

Fórmula para la obtención de límite de detección

$$LOD = \bar{x} + 3 * s_o'$$

Donde:

LOD = Límite de detección

\bar{x} = Promedio de las mediciones del blanco

s_o' = Desviación estándar experimental

- **Factores utilizados para el límite de cuantificación (LOQ)**

Es la cantidad más baja que se puede detectar en las mediciones por el método analítico, pero superior al LOD. El valor de LOQ se obtuvo haciendo uso de la fórmula donde se usa el valor de s_o' y el valor de un factor de multiplicación k_Q , detallado en la guía Eurachem (**Morillas et al., 2014**). Este parámetro se detalla en (**S. G. Rodríguez, 2019**).

Fórmula para el límite de cuantificación

$$LOQ = \bar{x} + 10 * s_o'$$

Donde:

LOQ = Límite de cuantificación

\bar{x} = Promedio de las mediciones del blanco

s_o' = Desviación estándar experimental

$k_Q = 10$

e. Factores utilizados para la sensibilidad

Mediante las curvas de calibración de adición de estándar, se obtuvieron mediciones por triplicado de cada una de las muestras para determinar los valores de las pendientes y como se relacionan entre ellas, se usó el valor de las pendientes para la comparación de las pendientes se usa la fórmula (**S. G. Rodríguez, 2019**).

Ecuación para obtener la pendiente

$$b = \frac{y - a}{x}$$

Donde:

b = pendiente de la curva de adición de estándar

y = valor de la absorbancia

a =intercepción con el eje y

x = concentración del analito

2.2.9 Determinación de la concentración de analito presentes en las muestras

Se determino la concentración de los conservantes ácido sórbico (E200), ácido benzoico (E210) y de la cafeína haciendo uso de las curvas de calibración realizadas previamente. Los valores obtenidos en Coca Cola Light, 220V y Monster de la concentración de los conservantes y de la cafeína, corresponden a la cantidad presente en los 10 mL iniciales usados para la determinación de la absorbancia.

2.2.10 Determinación de la incertidumbre

- Los datos utilizados en el parámetro de repetibilidad fueron usados para determinar la desviación estándar la cual fue utilizada para la determinación incertidumbre de tipo A (U_1) haciendo uso de la formula:

$$U_1 = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

U_1 = Incertidumbre tipo A

s = desviación estándar de las mediciones realizadas

n = número de repeticiones realizadas

- Los valores de la desviación estándar de la absorbancia dada por el equipo espectrofotométrico permitieron determinar la incertidumbre del equipo U_2 , para ello se hizo uso de la formula:

$$U_2 = \frac{E_m}{\sqrt{3}}$$

U_2 = Incertidumbre del equipo

E_m = Desviación estándar de la absorbancia del equipo

$\sqrt{3}$ = Constante

- Mientras que la incertidumbre del observador U_3 se obtuvo de los datos del parámetro de reproducibilidad, utilizando la formula:

$$U_3 = \frac{\delta d}{\sqrt{12}}$$

Donde

U_3 = Incertidumbre del observador

δd = Promedio de la desviación estándar de los 2 analistas

$\sqrt{12}$ = Numero de mediciones

- Al tener los valores de incertidumbre tanto tipo A y B, se determina la incertidumbre combina U_C , mediante la formula:

$$U_C = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}$$

- La incertidumbre expandida U se puede determinar mediante la multiplicación de la U_C con el factor de nivel de confianza “k”.

$$U = U_C * k$$

- Finalmente, el valor \bar{x} de medición de la absorbancia será dividido por el valor de U el cual se multiplicará por el 100 % para obtener el porcentaje de incertidumbre expandida % U.

$$\% U = \left(\frac{U}{\bar{x}_{Abs}} \right) * 100\%$$

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Verificación del Equipo Espectrofotométrico.

La verificación del equipo espectrofotométrico marca “Thermo Scientific EVOLUTION 60S” se realizó en el rango visible y ultravioleta, con el fin de tener el equipo calibrado, lo que nos permitió tener mediciones confiables de las muestras.

En el espectro visible se usaron los estándares de celdas especiales de vidrio montado en bastidores metálicos, estas celdas son de 3, 10, 30 y 50 % T. El kit de verificación nos da valores establecidos de % T y Abs, las mediciones de las muestras se realizaron por triplicado para poder obtener el valor del promedio, el cual se comparó con el valor establecido por el kit de calibración del equipo. El kit mediante el valor establecido nos brinda el criterio de “aceptación” o “rechazo” de las mediciones del equipo espectrofotométrico, donde los valores ubicados a la izquierda de cada columna del % T en la Tabla 6, y la Abs en la Tabla 7. Obteniendo resultados de aceptación para la verificación del equipo. Además, los datos detallados de la verificación del equipo se encuentran detallados desde la figura 14 hasta la figura 17 en la sección de Anexos 1.

Tabla 6. *Criterios de verificación del equipo mediante el % T en el rango visible.*

λ (nm)	3% T	10% T	30% T	50% T
400	$30,91 \geq 30,00$ acepta	$50,60 \geq 50,00$ acepta	$26,92 \geq 26,90$ acepta	$45,60 \geq 45,50$ acepta
456	$2,92 \geq 2,90$ acepta	$9,39 \geq 9,30$ acepta	$33,06 \geq 33,00$ acepta	$51,74 \geq 50,00$ acepta
546	$2,89 \geq 2,80$ acepta	$9,04 \geq 9,00$ acepta	$34,15 \geq 30,00$ acepta	$52,51 \geq 50,00$ acepta

590	2,41 ≥ 2,40 acepta	8,10 ≥ 8,00 acepta	31,37 ≥ 30,00 acepta	50,32 ≥ 50,00 acepta
653	2,96 ≥ 2,90 acepta	9,66 ≥ 9,60 acepta	30,91 ≥ 30,00 acepta	50,60 ≥ 50,00 acepta

Nota. Los criterios de aceptación del kit “spectronic Standards 2 SN: SA0996 Calibration Data Summary”, son que el Valor obtenido por el equipo ≥ Valor de referencia del kit.

Tabla 7. Criterios de verificación del equipo mediante la $Abs_{(\%T)}$ en el rango visible.

λ (nm)	Abs(3%T)	Abs(10%T)	Abs(30%T)	Abs(50%T)
400	1,676 ≥ 1,675 acepta	1,142 ≥ 1,129 acepta	0,573 ≥ 0,570 acepta	0,344 ≥ 0,342 acepta
456	1,540 ≥ 1,527 acepta	1,043 ≥ 1,031 acepta	0,481 ≥ 0,478 acepta	0,286 ≥ 0,285 acepta
546	1,556 ≥ 1,549 acepta	1,055 ≥ 1,045 acepta	0,467 ≥ 0,466 acepta	0,283 ≥ 0,280 acepta
590	1,677 ≥ 1,624 acepta	1,105 ≥ 1,095 acepta	0,503 ≥ 0,503 acepta	0,298 ≥ 0,298 acepta
653	1,539 ≥ 1,510 acepta	1,030 ≥ 1,019 acepta	0,510 ≥ 0,509 acepta	0,299 ≥ 0,297 acepta

Nota. Los criterios de aceptación del kit “spectronic Standards 2 SN: SA0996 Calibration Data Summary”, son que el Valor obtenido por el equipo ≥ Valor de referencia del kit.

Los resultados de verificación del equipo espectrofotométrico se realizaron mediante el uso de 3 estándares: celda de holmio, solución de dicromato de potasio con concentración de 600,6 mg/L y 60,06 mg/L, y cloruro de potasio con concentración de 12 g/L. Los resultados de criterio de aceptación se establecieron en base (O. M. Ruiz, 2014). Los resultados se “aceptaron” ya que el promedio de las mediciones se encuentra dentro del rango de longitud de onda de referencia ($\lambda_{\text{referencia}}$) del máximo y mínimo establecido, los valores obtenidos se detallan en la Tabla 8, 9 y 10.

Tabla 8. Resultados del parámetro de longitud de onda de espectrofotómetro en rango ultravioleta.

λ (nm)	$\lambda_{\text{referencia}}$ (nm)		Valor obtenido	
	máximo	Mínimo	\bar{x} mediciones	Resultado
241,15	242,15	240,15	241,45	acepta
287,15	288,15	286,15	287,38	Acepta
361,50	362,50	360,50	361,90	Acepta
536,30	539,30	533,30	536,65	Acepta

Tabla 9. Resultados del parámetro control de absorbancia de espectrofotómetro en rango ultravioleta

λ (nm)	$\lambda_{\text{referencia}}$ (nm)		Valor obtenido	
	Máximo	Mínimo	\bar{x} mediciones	Resultado
430,00	16,10	15,7	15,92	Acepta

350,00	109,00	105,6	108,78	Acepta
313,00	50,30	47,00	49,67	Acepta
257,00	146,20	142,80	143,19	Acepta
235,00	126,20	122,90	125,60	Acepta

Tabla 10. Resultados del parámetro control de la dispersión de la luz del espectrofotómetro en rango ultravioleta.

λ (nm)	λ referencia (nm)		Valor obtenido	Resultado
	Máximo	Mínimo	\bar{x} mediciones	
198,00	0,999	0	0,389	Acepta

3.2 Curva de Calibración de ácido sórbico.

La curva de calibración del ácido sórbico presento un valor de coeficiente de determinación $r^2 = 0,9993$, por este motivo se aceptó la curva de calibración, ya que el valor de referencia para $r^2 \geq 0,995$ para poder ser aceptado, los datos obtenidos se reportan en la Tabla 11. La curva de calibración se obtuvo mediante los 9 estándares con diferentes concentraciones y el blanco 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 25 mg/mL, se utilizó una longitud de onda de 260 nm para obtener la absorbancia. La absorbancia obtenida de la concentración de 1 mg/mL es un valor atípico, ya que al aplicar el test de Grubbs se determinó que el valor de Grubbs calculado (G_{cal}) = 1,1547 este valor es mayor al de Grubbs de tabla ($G_{crítico}$) = 1,1543 dicho valor se encuentra en la tabla de Test de Grubbs. Mediante el tests de Grubss no se puede eliminar valores presentes en las muestras analizadas, pero al determinar que se encuentra un valor atípico en dicha

concentración se procedió a quitar el estándar completo con la concentración de 1 mg/mL de la curva de calibración.

Tabla 11. *Concentraciones usadas en la curva de calibración de ácido sórbico*

eje “x” (mg)	eje “y” (Abs)	b	a	r ²
0	0			
2	0,003			
4	0,005			
6	0,007			
8	0,009	0,0011	0,0003	0,9993
10	0,011			
15	0,017			
20	0,022			
25	0,028			

Nota. El valor de $b = m$, $a = \text{intercepto}$, $r^2 = \text{coeficiente de determinación}$ el cual debe ser $\geq 0,995$.

3.3 Curva de Calibración de ácido benzoico.

La curva de calibración para el ácido benzoico se obtuvo realizando la absorbancia de 9 estándares con diferentes concentraciones 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 25 mg y el blanco, midió a un rango de longitud de onda de 230 nm, se obtuvo un valor de coeficiente de determinación $r^2 = 0,9995$ detallado en la Tabla 12. Se aplicó el test de Grubbs donde todas las mediciones tuvieron un resultado de aceptación al no encontrarse valores atípicos, la curva de calibración cumple con los parámetros establecidos, ya que su valor es superior al establecido que es $r^2 = 0,995$.

Tabla 12. Concentraciones usadas en la curva de calibración de ácido benzoico.

eje "x" (mg)	eje "y" (Abs)	b	a	r ²
0	0			
1	0,005			
2	0,009			
4	0,016			
6	0,022	0,0035	0,0013	0,9995
8	0,030			
10	0,036			
15	0,053			
20	0,071			
25	0,089			

Nota. El valor de $b = m$, $a =$ intercepto, $r^2 =$ coeficiente de determinación el cual debe ser $\geq 0,995$.

3.4 Curva de Calibración de cafeína.

La curva de calibración de cafeína nos dio un valor de coeficiente de determinación $r^2 = 0,9991$ y se realizó con 9 concentraciones de 1; 2; 3; 5; 10; 12; 16; 20; 25 mg/mL y el blanco, donde la absorbancia se obtuvo a un rango de longitud de onda en 276 nm, los valores por triplicado se sometieron al test de Grubbs, donde todos los valores de $G_{cal} \leq G_{crítico}$ por tal razón tuvieron un criterio de aceptación cada una de las absorbancias de las concentraciones utilizadas al no encontrarse valores atípicos, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones usadas en la curva de calibración de cafeína.

eje “x” (mg)	eje “y” (Abs)	b	a	r ²
0	0			
1	0,008			
2	0,015			
3	0,018			
5	0,033	0,006	0,0011	0,9991
10	0,060			
12	0,071			
16	0,098			
20	0,120			
25	0,153			

Nota. El valor de $b = m$, $a =$ intercepto, $r^2 =$ coeficiente de determinación el cual es $> 0,995$.

3.5 Utilización de los parámetros analíticos para el análisis de los datos

a. Análisis de la precisión

- **Repetitividad**

Mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) elaborado en Excel, donde se realizó las mediciones de ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína, donde se determinó la media, desviación estándar, % CV y el valor de prueba de Fisher, los valores se detallan en las Tablas 14, 15 y 16. Al someter la muestra de concentración de 10 mg/mL a las cuales se les realizó 10 mediciones en 3 días diferentes, se identificó que no existe una diferencia significativa entre las mediciones realizadas en los 3 días diferentes todo en base a lo detallado en **(Rivera & Rodriguez, 2010)**.

Tabla 14. Repetibilidad en muestras con 10 mg/mL, que contienen ácido sórbico.

Día	Muestra	\bar{x}	S	% CV _{cal} < % CV _{horwitz}	F _{crítico} > F _{cal}
1		0,050	0,00200	4,00 < 5,6	
2	Coca	0,051	0,00267	5,29 < 5,6	3,3541 > 0,1890
	Cola				
3	Light	0,050	0,00190	3,76 < 5,6	
1		0,060	0,00210	3,51 < 5,6	
2	220 V	0,059	0,00193	3,26 < 5,6	3,3541 > 1,4152
3		0,061	0,00230	3,78 < 5,6	
1		0,075	0,00317	4,26 < 5,6	
2	Monster	0,073	0,00322	4,41 < 5,6	3,3541 > 0,8752
3		0,075	0,00363	4,84 < 5,6	

Nota: No existe diferencias significativas, ya que los valores de % CV_{cal} y F_{cal} son menores a los valores de referencia % CV_{horwitz} y F_{crítico}, por lo tanto, se obtuvo un resultado de aceptación.

Tabla 15. Repetibilidad en muestras con 10 mg/mL, que contienen ácido benzoico.

Día	Muestra	\bar{x}	S	% CV _{cal} < % CV _{horwitz}	F _{crítico} > F _{cal}
1		0,040	0,00170	4,23 < 5,6	

2	Coca	0,040	0,00126	3,19 < 5,6	
	Cola				3,3541 > 0,6037
3	Light	0,040	0,00162	4,03 < 5,6	
1		0,053	0,00210	3,94 < 5,6	
2		0,053	0,00237	4,50 < 5,6	
	220 V				3,3541 > 0,3777
3		0,052	0,00258	4,94 < 5,6	
1		0,045	0,00317	4,14 < 5,6	
2	Monster	0,044	0,00322	5,21 < 5,6	
					3,3541 > 0,4741
3		0,044	0,00363	4,71 < 5,6	

Nota: No existe diferencias significativas, ya que los valores de % CV_{cal} y F_{cal} son menores a los valores de referencia % $CV_{horwitz}$ y $F_{crítico}$, por lo tanto, se obtuvo un resultado de aceptación.

Tabla 16. Repetibilidad en muestras con 10 mg/mL, que contienen cafeína.

Día	Muestra	\bar{x}	S	% CV_{cal} < % $CV_{horwitz}$	$F_{crítico}$ > F_{cal}
1		0,143	0,00469	3,29 < 5,6	
2	Coca	0,144	0,00431	2,99 < 5,6	3,3541 > 0,3078
	Cola				
3	Light	0,144	0,00352	2,45 < 5,6	

1		0,082	0,00343	4,17 < 5,6	
2		0,083	0,00353	4,25 < 5,6	3,3541 > 0,1372
	220 V				
3		0,083	0,00371	4,48 < 5,6	
1		0,119	0,00494	4,16 < 5,6	
2	Monster	0,118	0,00473	4,00 < 5,6	3,3541 > 0,0466
3		0,118	0,00551	4,66 < 5,6	

Nota: No existe diferencias significativas, ya que los valores de % CV_{cal} y F_{cal} son menores a los valores de referencia % $CV_{horwitz}$ y $F_{crítico}$, por lo tanto, se obtuvo un resultado de aceptación.

- **Reproducibilidad**

La reproducibilidad se obtuvo el resultado de aprobación de dos estadísticos, el primero mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA), para obtener los valores de la prueba de Fisher ($F_{crítico} > F_{cal}$) y la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, para determinar los valores para t-Student ($t_{crítico} > t_{cal}$) como lo describe (Torres, 2018). Donde ambas pruebas dieron como resultado se “acepta”, los valores obtenidos son detallados en las Tablas 17, 18 y 19:

Tabla 17. *Reproducibilidad con criterio de aceptación mediante prueba de Fisher y t-Student con muestras que contienen ácido sórbico con una concentración de 10 mg/mL.*

Día	Muestra	Analista	$F_{crítico} > F_{cal}$	$t_{crítico} > t_{cal}$
1	Coca Cola Light	1	4,9646 > 0,1695	2,2281 > 0,6892
		2		

2	Coca Cola Light	1	4,9646 > 0,1169	2,2622 > 0,7403
		2		
1	220 V	1	4,9646 > 1,6234	2,2281 > 0,2314
		2		
2	220V	1	4,9646 > 0,3226	2,2281 > 0,5826
		2		
1	Monster	1	4,9646 > 0,8345	2,2281 > 0,3825
		2		
2	Monster	1	4,9646 > 0,6164	2,2281 > 0,4506
		2		

Nota: Ambos resultados de las pruebas realizadas F_{cal} y t_{cal} son menores a los valores de $F_{crítico}$ y $t_{crítico}$, por lo cual se puede concluir que no existe diferencias significativas entre los resultados de reproducibilidad.

Tabla 18. *Reproducibilidad con criterio de aceptación mediante prueba de Fisher y t-Student con muestras que contienen ácido benzoico con una concentración de 10 mg/mL.*

Día	Muestra	Analista	$F_{crítico} > F_{cal}$	$t_{crítico} > t_{cal}$
		1		
1	Coca Cola Light	2	4,9646 > 0,2195	2,2281 > 0,6495
		1		
2	Coca Cola Light	2	4,9646 > 0,2041	2,2622 > 0,6621

		1		
1	220 V	2	$4,9646 > 1,4211$	$2,3060 > 0,2674$
		1		
2	220V	2	$4,9646 > 0,00$	$2,2622 > 1,00$
		1		
1	Monster	2	$4,9646 > 2,0779$	$2,4469 > 0,1995$
		1		
2	Monster	2	$4,9646 > 0,2286$	$2,2281 > 0,6429$

Nota: Ambos resultados de las pruebas realizadas F_{cal} y t_{cal} son menores a los valores de $F_{crítico}$ y $t_{crítico}$, por lo cual se puede concluir que no existe diferencias significativas entre los resultados de reproducibilidad.

Tabla 19. *Reproducibilidad con criterio de aceptación mediante prueba de Fisher y t-Student con muestras que contienen cafeína con una concentración de 10 mg/mL.*

Día	Muestra	Analista	$F_{crítico} > F_{cal}$	$t_{crítico} > t_{cal}$
	Coca Cola	1		
1	Light	2	$4,9646 > 1,0191$	$2,3060 > 0,3423$
	Coca Cola	1		
2	Light	2	$4,9646 > 0,1096$	$2,2281 > 0,7475$

		1		
1	220 V	2	$4,9646 > 0,4545$	$2,2281 > 0,5155$
		1		
2	220V	2	$4,9646 > 0,2332$	$2,2281 > 0,6396$
		1		
1	Monster	2	$4,9646 > 0,1020$	$2,2281 > 0,7560$
		1		
2	Monster	2	$4,9646 > 1,2162$	$2,2281 > 0,2959$

Nota: Ambos resultados de las pruebas realizadas F_{cal} y t_{cal} son menores a los valores de $F_{crítico}$ y $t_{crítico}$, por lo cual se puede concluir que no existe diferencias significativas entre los resultados de reproducibilidad.

b. Análisis de exactitud

La exactitud nos permite detectar Abs en las muestras, las cuales al ser comparada con la $Abs_{prevista}$ están dentro del rango de aceptación que es entre el 80 % al 110 %, de esta manera los resultados fueron se “acepta” estos criterios fueron tomados de (**López & Murillo, 2017**). Los valores del error absoluto son pequeños, con lo cual se puede decir que no existe diferencias significativas entre las mediciones, mientras que los valores del error relativo fueron ≤ 5 % establecidos como un buen parámetro de exactitud, los resultados se reportan en las Tablas 20, 21 y 22.

Tabla 20. *Parámetros para determinar la presencia de ácido sórbico en las muestras mediante la exactitud.*

Muestra	$\bar{x}(\text{Abs}_{\text{prevista}})$	$\bar{x}(\text{Abs}_{\text{obtenida}})$	%Error _{absoluto}	%Error _{relativo}
Coca	0,050	0,049	1,56 %	1,58 %
Cola Light				
220V	0,060	0,059	1,95 %	1,97 %
Monster	0,075	0,075	2,24 %	2,23 %

Nota. Los valores obtenidos del parámetro de exactitud están dentro de los rangos de aceptación.

Tabla 21. *Parámetros para determinar la presencia de ácido benzoico en las muestras mediante la exactitud.*

Muestra	$\bar{x}(\text{Abs}_{\text{prevista}})$	$\bar{x}(\text{Abs}_{\text{obtenida}})$	%Error _{absoluto}	%Error _{relativo}
Coca	0,040	0,039	2,21 %	2,27 %
Cola Light				
220V	0,053	0,052	2,51 %	2,55 %
Monster	0,045	0,045	2,25 %	2,24 %

Nota. Los valores obtenidos del parámetro de exactitud están dentro de los rangos de aceptación.

Tabla 22. *Parámetros para determinar la presencia de cafeína en las muestras mediante la exactitud.*

Muestra	$\bar{x}(\text{Abs}_{\text{prevista}})$	$\bar{x}(\text{Abs}_{\text{obtenida}})$	%Error _{absoluto}	%Error _{relativo}
Coca	0,143	0,142	0,70 %	0,70 %
Cola Light				
220V	0,082	0,081	1,11 %	1,10 %
Monster	0,119	0,119	1,12 %	1,24 %

Nota. Los valores obtenidos del parámetro de exactitud están dentro de los rangos de aceptación.

c. Análisis del rango lineal

La linealidad mostro factores como la pendiente, el intercepto, la desviación estándar, el coeficiente de es la representación mediante un gráfico entre la relación que presenta la concentración del analito y la absorbancia obtenida (Marroquín, 2015). Mediante mediciones por triplicado de concentraciones conocidas de 2; 3; 5; 7; 9; 10 mg/mL, se obtiene el promedio de los valores de absorbancia los cuales servirán para realizar la curva de calibración. Los valores obtenidos de este parámetro analítico se reportan en la Tabla 23, 24 y 25

Tabla 23. *Parámetros de linealidad obtenidos de las muestras con ácido sórbico.*

Muestra	b	a	r	r²
Coca Cola Light	0,0052	0,0001	0,9996	0,9992
220 V	0,0056	0,0004	0,9995	0,9991

Monster	0,0071	0,001	0,9995	0,9991
---------	--------	-------	--------	--------

Nota. Los valores obtenidos del rango lineal, b = pendiente, a = intercepto, r = coeficiente de correlación, r² = coeficiente de determinación.

Tabla 24. *Parámetros de linealidad obtenidos de las muestras con ácido benzoico.*

Muestra	b	a	r	r ²
Coca Cola Light	0,0039	0,0001	0,9995	0,9990
220 V	0,0051	0,0005	0,9995	0,9990
Monster	0,0044	0,0007	0,9995	0,9991

Nota. Los valores obtenidos del rango lineal, b = pendiente, a = intercepto, r = coeficiente de correlación, r² = coeficiente de determinación.

Tabla 25. *Parámetros de linealidad obtenidos de las muestras con cafeína.*

Muestra	b	a	r	r ²
Coca Cola Light	0,0141	0,0025	0,9995	0,9991
220 V	0,0078	0,0014	0,9995	0,9991
Monster	0,0112	0,0012	0,9995	0,9991

Nota. Los valores obtenidos del rango lineal, b = pendiente, a = intercepto, r = coeficiente de correlación, r² = coeficiente de determinación.

d. Análisis del intervalo de trabajo

Se determino mediante mediciones sucesivas del blanco en repeticiones sucesivas por triplicado, de las cuales se obtuvo valor del promedio y la desviación estándar, para luego obtener la desviación estándar experimental, la cual es utilizada para determinar el LOD y el LOQ, de esta forma se determinó las cantidades mínimas que pueden ser detectadas por el equipo espectrofotométrico. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 26, 27 y 28.

Tabla 26. *Determinación del LOD y LOQ mediante espectrofotometría en las muestras de ácido sórbico.*

Muestras	\bar{x}	s_0	s_0'	LOD (mg)	LOQ (mg)
Coca Cola Light	0,001	0,00044	0,00018	0,64	2,45
220 V	0,002	0,00080	0,00033	0,64	2,45
Monster	0,005	0,00141	0,00058	1,55	4,96

Tabla 27. *Determinación del LOD y LOQ mediante espectrofotometría en las muestras de ácido benzoico.*

Muestras	\bar{x}	s_0	s_0'	LOD (mg)	LOQ (mg)
Coca Cola Light	0,008	0,00247	0,00101	0,49	2,49
220 V	0,005	0,00081	0,00033	0,09	0,49
Monster	0,010	0,00042	0,00107	0,09	0,77

Tabla 28. *Determinación del LOD y LOQ mediante espectrofotometría en las muestras de cafeína.*

Muestras	\bar{x}	s_0	s_0'	LOD (mg)	LOQ (mg)
Coca Cola Light	0,008	0,00191	0,00078	1,11	2,48
220 V	0,017	0,00160	0,00065	2,56	3,65
Monster	0,019	0,00075	0,00031	0,02	3,48

e. Análisis de la sensibilidad

Se utilizo el valor de las pendientes para determinar si existe una igualdad entre las muestras, donde estas deben tener valores cercanos entre ellos, el criterio de aceptación se logro utilizando la prueba de Fisher, donde el valor de F_{cal} debe ser menor al valor de $F_{crítico}$ (S. G. Rodríguez, 2019). Los datos reportados se muestran en la Tabla 29, 30 y 31.

Tabla 29. *Sensibilidad de las pendientes en muestras que contienen ácido sórbico.*

Muestra	Pendiente	Desviación estándar	$F_{cal} < F_{crítico}$
Coca Cola Light	b_1	0,0050	s_1 0,01843
	b_2	0,0052	s_2 0,01943
	b_3	0,0052	s_3 0,01950

220 V	b ₁	0,0054	s ₁	0,02019	0,1696 < 3,5546
	b ₂	0,0049	s ₂	0,01813	
	b ₃	0,0065	s ₃	0,02417	
Monster	b ₁	0,0064	s ₁	0,02397	0,0760 < 3,5546
	b ₂	0,0073	s ₂	0,02727	
	b ₃	0,0073	s ₃	0,02709	

Tabla 30. *Sensibilidad de las pendientes en muestras que contienen ácido benzoico.*

Muestra	Pendiente	Desviación estándar	F _{cal} < F _{crítico}	
Coca Cola Light	b ₁	0,0037	s ₁ 0,01369	0,0512 < 3,5546
	b ₂	0,0038	s ₂ 0,01402	
	b ₃	0,0043	s ₃ 0,01596	
220 V	b ₁	0,0050	s ₁ 0,01846	0,0512 < 3,5546
	b ₂	0,0047	s ₂ 0,01754	
	b ₃	0,0055	s ₃ 0,02061	

	b ₁	0,0043	s ₁	0,02397	
Monster	b ₂	0,0045	s ₂	0,02727	0,0258 < 3,5546
	b ₃	0,0045	s ₃	0,02709	

Tabla 31. *Sensibilidad de las pendientes en muestras que contienen cafeína.*

Muestra	Pendiente	Desviación estándar	F_{cal} < F_{crítico}		
Coca	b ₁	0,0149	s ₁	0,05530	
Cola Light	b ₂	0,0136	s ₂	0,05047	0,1005 < 3,5546
	b ₃	0,0138	s ₃	0,05133	
	b ₁	0,0084	s ₁	0,03123	
220 V	b ₂	0,0072	s ₂	0,02701	0,0249 < 3,5546
	b ₃	0,0077	s ₃	0,02880	
	b ₁	0,0107	s ₁	0,03976	
Monster	b ₂	0,0116	s ₂	0,04320	0,0537 < 3,5546
	b ₃	0,0112	s ₃	0,04178	

3.6 Resultados de la determinación del analito presentes en las muestras.

Se determinó la concentración de los analitos ácido sórbico, ácido benzoico haciendo uso de las curvas de calibración realizadas previamente, lo cual permitió tener los valores de concentración de las muestras Coca Cola Light, 220V y Monster. Las muestras analizadas están dentro de los valores sugeridos y son detallados en la tabla 32, 33 y 34. Se implementa la norma técnica ecuatoriana NTE INEN-CODEX 192, la cual estipula que en la categoría de alimento 14.1.4 y categoría de alimento 14.2.7, donde la concentración de ácido sórbico es de 500 mg/L para las bebidas gaseosas y bebidas energizantes. Mientras que para ácido benzoico es de 1000 mg/L en las bebidas gaseosas y de 600 mg/L para las bebidas energizantes (**NTE INEN-CODEX 192, 2013**). Las concentraciones de cafeína de las muestras analizadas deben estar dentro del rango estipulado para bebidas gaseosas, de acuerdo a la norma INEN 1101 donde se estipula que es de 200 mg/L (**INEN 1101, 2017**). Mientras que la concentración estipulada por la norma INEN 2411 detalla que es de 320 mg/L para bebidas energizantes (**NTE INEN 2411, 2015**). Los valores están dentro de los parámetros establecidos por las normas INEN, de esta forma se acepta la hipótesis alternativa ya que los valores son significativos para el control de calidad.

Tabla 32. Concentración de ácido sórbico en las muestras.

Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma CODEX 192 (mg/L)
Coca Cola Light	0,64	6,34	500
Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma CODEX 192 (mg/L)
220V	1,55	15,45	500
Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma CODEX 192 (mg/L)
Monster	4,27	42,73	500

Nota. La norma técnica es obtenida de NTE INEN-CODEX 192, la cual establece los límites de concentración de conservantes en la bebida gaseosa y energizantes.

Tabla 33. *Concentración de ácido benzoico en las muestras.*

Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma CODEX 192 (mg/L)
Coca Cola Light	1,91	19,14	1000
Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma CODEX 192 (mg/L)
220V	1,06	10,57	600
Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma CODEX 192 (mg/L)
Monster	2,49	24,86	600

Nota. La norma técnica es obtenida de NTE INEN-CODEX 192, la cual establece los límites de concentración de conservantes en la bebida gaseosa y energizantes.

Tabla 34. *Concentración de cafeína en las muestras.*

Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma INEN 1101 (mg/L)
Coca Cola Light	1,15	11,50	200
Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma INEN 2411 (mg/L)
220V	2,65	26,50	320
Muestra	10 ml (mg/mL)	100 ml (mg/mL)	Norma INEN 2411 (mg/L)
Monster	2,98	29,83	320

Nota. La norma técnica es obtenida de INEN 1101 y NTE INEN 2411, las cuales establece los límites de concentración de cafeína en la bebida gaseosa y energizantes.

3.7 Resultados de la Determinación de la incertidumbre

Se utilizo las fórmulas descritas previamente para el cálculo de la incertidumbre donde se aplicó la incertidumbre de repetibilidad, de la verificación del equipo, de reproducibilidad. Estos valores permiten determinar incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida, mediante estos valores se obtuvo un % U el cual debe ser \leq al 30 %. Los valores obtenidos fueron menor al porcentaje establecido, de esta manera se determinó que existe una baja incertidumbre de las mediciones de absorbancia. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 35, 36 y 37.

Tabla 35. *Incertidumbre en las muestras con ácido sórbico.*

Incertidumbre	Muestra		
	Coca Cola Light	220 V	Monster
U ₁	0,000393	0,000392	0,000608
U ₂	0,001155	0,001155	0,001155
U ₃	0,000573	0,000630	0,000940
U _c	0,001348	0,001373	0,001608
U	± 1,99 mg	± 2,04 mg	± 2,49 mg
% U	5,36 %	4,58 %	4,33 %

Tabla 36. *Incertidumbre en las muestras con ácido benzoico.*

Incertidumbre	Muestra		
	Coca Cola Light	220 V	Monster
U₁	0,000277	0,000421	0,000371
U₂	0,001155	0,001155	0,001155
U₃	0,000443	0,000667	0,000617
U_c	0,001268	0,001398	0,001361
U	± 0,29 mg	± 0,37 mg	± 0,35 mg
% U	6,33 %	5,31 %	6,18 %

Tabla 37. *Incertidumbre en las muestras con cafeína.*

Incertidumbre	Muestra		
	Coca Cola Light	220 V	Monster
U₁	0,000749	0,000629	0,000895
U₂	0,001155	0,001155	0,001155
U₃	0,001227	0,000990	0,001413

U_c	0,001844	0,001646	0,002032
U	$\pm 0,41$ mg	$\pm 0,34$ mg	$\pm 0,47$ mg
$\% U$	2,57 %	3,98 %	3,43 %

3.8 Comparación de los valores espectrofotométricos y cromatográficos.

El método cromatográfico detecta concentraciones $\mu\text{g/L}$ en las muestras analizadas, las cuales son más pequeñas en comparación a los mg/L detectados por el método espectrofotométrico. Por esta razón al buscar la comparación de los resultados entre el método cromatográfico y espectrofotométrico, no es posible realizarlo por las concentraciones obtenidas de las muestras analizadas ya que existe una diferencia. Pero se puede lograr la comparación entre estos 2 métodos, al usar el valor del porcentaje de concordancia de medición (% CM) el cual se obtiene al aplicar parámetros de repetibilidad, reproducibilidad y veracidad de los valores obtenidos de los análisis de las muestras de bebidas azucaradas. Cabe recalcar que en investigaciones previas para la determinación de ácido sórbico y ácido benzoico en bebidas azucaradas utilizando el método cromatográfico, se registraron mediciones del % CM que se encuentran entre el 80,4 % y el 104,8 % detallados en **(Danchana et al., 2021)**. Mientras que en el método cromatográfico aplicado para la determinación de sorbatos y benzoatos presentan valores del % CM entre 91 % al 107 % **(Salcedo et al., 2019)**. En la investigación para la determinación de conservantes y otros aditivos alimentarios usando el equipo de HPLC se obtuvieron valores de % CM entre 84,97 % y el 122 % **(Cabana, 2020)**. Mientras que para la investigación de la cuantificación de sacarina, benzoatos y cafeína en bebidas energizantes usando HPLC se obtuvieron valores de % CM de 98 % **(Torrico, 2020)**. En cuanto a los valores obtenidos por el método espectrofotométrico % CM están entre el 93,98 % hasta el 104,7 %, por tal motivo al ser comparados con los valores de las investigaciones previas de HPLC, demuestran que están dentro del rango registrado por estas investigaciones previas

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

La verificación del equipo espectrofotométrico 60S EVOLUTION, haciendo uso del kit de verificación para el rango visible y utilizando celda de holmio y soluciones estándares específicas para rango ultravioleta, permitieron tener un criterio de aceptación del equipo, corroborando que se encuentra calibrado y que su desviación estándar al realizar las mediciones de absorbancia está dada por $\pm 0,002$, permitiéndonos realizar la lectura de absorbancia de las muestras con alta fidelidad. La creación de curvas de calibración para ácido sórbico, ácido benzoico y cafeína tuvieron un criterio de aceptación adecuado, ya que al tener valores superiores al coeficiente de determinación establecido que fue de $r^2 = 0,995$, nos permitieron determinar la concentración de los analitos mencionados en las muestras de Coca Cola Light, 220V y Monster, donde los valores obtenidos están dentro de los rangos establecidos por la norma INEN. La aplicación del pretratamiento y tratamiento de las muestras demostró ser de utilidad ya que se pudo determinar la absorbancia de manera rápida y efectiva, ya que al querer realizar las mediciones con muestras sin el pretratamiento no se logró obtener ningún valor de la absorbancia. La aplicación del método de adición de estándar sirvió para eliminar el efecto matriz de las bebidas azucaradas usadas como muestras, además de poder aplicar los parámetros analíticos a los valores obtenidos de las muestras analizadas.

Mediante la aplicación de los parámetros analíticos: precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, rango lineal, intervalo de trabajo, sensibilidad, y la incertidumbre, así como el uso de sus fórmulas específicas para cada parámetro analítico. Los criterios de aceptación fueron tomados en base a las pruebas de Fisher, prueba de t-Students, % CV de Horwitz, % Error absoluto, % Error relativo, % U, mediante estos se logró determinar que se “acepta” las mediciones para cada una de los parámetros analíticos aplicados a las muestras de bebidas azucaradas. De esta manera se pudo validar el método de cuantificación simultánea mediante el método de adición de estándar en bebidas azucaradas de conservantes y cafeína mediante el uso del espectrofotómetro en rango ultravioleta.

Al realizar la comparación de la concentración obtenida en las muestras de bebida azucarada carbonatada y energizantes, se logró obtener valores que están dentro de las normas INEN establecidas, demostrando que las bebidas tienen las concentraciones de conservantes y cafeína dentro de la norma técnica, pudiendo aceptar la hipótesis alternativa demostrando que los valores son significativos para el control de calidad. En cuanto a los valores de incertidumbre demuestran que las mediciones no tienen una gran variabilidad al momento de tener el valor final, además se demostró que el porcentaje de incertidumbre expandida está dentro de los valores establecidos.

Se comparo los valores del porcentaje de concordancia de las mediciones obtenidas implementando el método espectrofotométrico y los valores de investigaciones previas obtenidos usando el método cromatográfico. Lo cual permitió determinar que los valores de la validación del método tienen concordancia y están dentro de los rangos establecidos en base a las investigaciones previas.

4.2 Recomendaciones

Las muestras de Coca Cola Light, 220V y Monster deben ser pretratadas, ya que deben tener una tonalidad la cual pueda ser medido por el equipo espectrofotométrico.

Las celdas utilizadas para realizar la lectura de las muestras deben ser de cuarzo, debido a que estas celdas son especiales para las mediciones del rango ultravioleta. Ya que, al realizar las mediciones con celdas de plástico, no se logró obtener ningún valor de absorbancia.

Las celdas de cuarzo deben ser lavadas con la muestra después de cada medición de los estándares ya que al ser lavadas con agua destilada, agua bidestilada generan cambios en las lecturas de absorbancia.

Los conservantes ácido sórbico, ácido benzoico deben ser agregados a los balones de aforo con una pequeña cantidad del solvente y ser homogenizados para lograr su dilución, ya que si no se lo hace es difícil lograrlo al aforar completamente los balones con todo el solvente.

BIBLIOGRAFÍA

- Adarme, T. C., & Rincones, M. P. (2008). *Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8555/tesis140.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- AGQ Labs Chile S.A, L. O.-S. (2017). Artículo técnico: Análisis químico, medir es comparar. In *Área Salud y Seguridad* (Vol. 0, Issue 0). <https://agqlabs.cl/wp-content/uploads/Analisis-quimico-medir-es-comparar.pdf>
- Amaya, J. L. (2017). *Antimicrobianos químicos en la industria alimentaria* [Universidad Nacional de Trujillo]. [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10014/Amaya Arana Jackieline Lorena.pdf?sequence=1](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10014/Amaya_Arana_Jackieline_Lorena.pdf?sequence=1)
- Arias, D. M., & Claro, J. E. (2006). *Evaluación De Cinco Conservantes Adicionados Sobre Diferentes Tipos De Almidones Para Ser Empleados En Procesos De Restauración En El Patrimonio Documental* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8274/tesis256.pdf?sequence=1>
- Aşçi, B., Dinç, Ş. Z., & Aksu, Ö. D. (2016). Development and Validation of HPLC Method for the Simultaneous Determination of Five Food Additives and Caffeine in Soft Drinks. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/2879406>
- Asistencia, L. N. de la S. de S. y, Público, L. C. de la S. de H. y credito, Dirección General de Control de Alimentos, B. y M. S. de S. y A., Cámara Nacional de la Industria de Transformación. Departamento de Normas. Elías Pando, S.A. de C.V. Compañía Nestlé, S. A., & Kraft Foods de México, S.A. de C.V. Pepsi Cola Mexicana, S. . (1978). *Determinación de benzoatos, salicilatos y sorbatos en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.* <https://media.gotomexico.today/reglament/nmx-f-309-s-1978.pdf>

- Azuma, S. L., Quartey, N. K. A., & Ofosu, I. W. (2020). Sodium benzoate in non-alcoholic carbonated (soft) drinks: Exposure and health risks. *Scientific African*, *10*, e00611. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00611>
- Cabana, R. A. (2020). Perfil de Riesgo en Sorbatos y Benzoatos en Bebidas a Base de Fruta No Gaseosas en Colombia [Universidad De La Salle]. In *Ciencia*. https://ciencias.lasalle.edu.co/ing_alimentos/717
- Camaró, M. L., Martínez, R. G., Olmos, P. M., Catalá, V. C., Ocete, M. D., & Gimeno, C. C. (2014). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Monografías*, *33*(7), e31–e36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- Camelino, S. O., Minchiotti, M., Bariles, R., Lòpez, R. P., & Colazo, J. (2018). Optimización de un procedimiento para la determinación de oro mediante espectrofotometría UV/Vis. *Revista Materia*, *23*(2), 2–8. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620180002.0342>
- Campos, C. A. (1995). *Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos* [Universidad de Buenos Aires]. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2705_Campos.pdf
- Cáñez, M. G., & García, A. M. (2015). Validación De Un Método Analítico Para La Determinación De Fósforo Por Espectrofotometría Ultravioleta-Visible. *BIOtecnia*, *17*(1), 32–39. <https://doi.org/10.18633/bt.v17i1.15>
- Cárdenas, D. S., Calvo, V. D., Flórez, S., Sepúlveda, D. M., & Manjarrés, L. M. (2019). Consumption of sugary drinks and sugar added to beverages and their relationship with anthropometric indicators in young people from medellín (Colombia). *Nutricion Hospitalaria*, *36*(6), 1346–1353. <https://doi.org/10.20960/nh.02671>
- Cárdenas, J. J., Ramírez, A. F., & Delgado, E. T. (2018). Evaluación y aplicación de la incertidumbre de medición en la determinación de las emisiones de fuentes fijas: una revisión. *TecnoLógicas*, *21*(42), 231–244. <https://doi.org/10.22430/22565337.790>

- Castaño, M. A. (2019). *Dopaje de PEDOT:PSS con óxido de grafeno para la fabricación de celdas solares de perovskita*. [Universidad de los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/44498/u830301.pdf?sequence=1>
- Castillo, B. A., & González, R. H. (2015). Protocolo de validacion de metodos analiticos para la cuantificacion de farmacos. *Rev Cubana Farm*, 30(1), 1–9. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/39980315/Protocolo_de_validacion_de_metodos_analiticos_para_la_cuantificacion_de_farmacos-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1637694436&Signature=eAwHgHcnkjYCKulejHCoptxBj2-w4g6bisblbDIstknKE~ysdagPcGxCSRUKp0ebDr-LHiBnqJO
- Cervantes, G. (2009). *CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VITAMINAS B1, B6 Y CIANOCOBALAMINA PRESENTES EN UN INYECTABLE MEDIANTE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO MULTIVARIABLE* [Universidad Nacional Autónoma de México]. [file:///C:/Users/Javier Ojeda/Downloads/TESIS/4.PERFIL DE TESIS/9. BIBLIOGRAFIA PARA LA TESIS/Cuantificación simultanea.pdf](file:///C:/Users/Javier%20Ojeda/Downloads/TESIS/4.PERFIL%20DE%20TESIS/9.BIBLIOGRAFIA%20PARA%20LA%20TESIS/Cuantificaci3n%20simultanea.pdf)
- CPE INEN-CODEX, C. 59. (2014). *DIRECTRICES SOBRE LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS (CAC/GL 59-2006, IDT)*.
- Cruz, V. M., Urquizu, M. R., Valls, V. I., Manresa, J. M., Ruiz, G. B., Urquizu, M. R., & Toran, P. (2020). Consumption of soft, sports, and energy drinks in adolescents. The BEENIS study. *Anales de Pediatría*, 93(4), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.01.004>
- Danchana, K., Jitthiang, P., Uraisin, K., & Cerdà, V. (2021). WinMLR program for the determination of sorbic and benzoic acids in food samples. *Food Chemistry*, 361(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130086>
- Díaz, M. D. (2015). *DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE SISTEMA INFORMÁTICO Y DE LA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE DATOS, EN EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS SERVICIOS DE LOS LABORATORIOS DE METROLOGÍA DE CIDESI*. [Centro De Ingeniería y

Desarrollo Industrial].
<https://cidesi.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1024/363/1/M-MDDO-2015.pdf>

Espejo, M. C. (2016). Importancia de la calibración en los laboratorios de química analítica [Universidad de Sevilla]. In *Universidad de Sevilla Facultad de Farmacia* (Vol. 0, Issue 0).
[https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/54518/IMPORTANCIA DE LA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/54518/IMPORTANCIA_DE_LA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Eurachem/CITAC. (2012). Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, Guía CG 4. In *Eurachem/Citac: Vol. 3rd Editio.*
https://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf

Fernández, M. M. (2016). *Degradación de fenolftaleína por medio de la reacción Fenton con nanoestructuras de hierro* [Universidad Autónoma Del Estado De México]. [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/65618/TESIS MARIANA FERNÁNDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/65618/TESIS_MARIANA_FERNÁNDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Gary, C. (2009). QUIMICA ANALITICA 6ta EDICION. In I. MMV John Wiley & Sons (Ed.), *QUÍMICA ANALÍTICA Sexta Edición* (Sexta Edic, pp. 533–534). McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES,S.A DE C.V.
http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/AnalisisInstrumental/images/Quimica_Analitica.pdf

Gonzáles, D. P., & Poveda, L. P. (2014). *ESTUDIOS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD EN LOS PROCESOS PRODUCTIVOS Y DE INSPECCIÓN DE INDUMIL FÁBRICA SANTA BÁRBARA.* 127.
<https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/saglikli-beslenme-hareketli-hayat-db/Yayinlar/kitaplar/diger-kitaplar/TBSA-Beslenme-Yayini.pdf>

Gonzáles, E. G., & Neira, J. M. (2014). *CONSUMO E IMPACTO DE BEBIDAS ENERGIZANTES EN LOS ADOLESCENTES. UNIDAD EDUCATIVA “INNOVA SCHOOL” Y COLEGIO FISCAL TÉCNICO “MUEY”. SALINAS. 2013-2014.* [Universidad Estatal Península De Santa Elena].

[https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/1681/1/GONZALEZ TOMALA-NEIRA QUIRUMBAY.pdf](https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/1681/1/GONZALEZ%20MALA-NEIRA%20QUIRUMBAY.pdf)

Guano, J. G. (2019). *Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Ingeniera en Contabilidad y Auditoría CPA*. 106. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29973/1/T4584i.pdf>

GUM-JCGM, C. E. de M. (2008). *Evaluación de datos de medición “Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida”* (Vol. 1, Issue 1).

Guzman, A. A., & Rivera, R. L. (2020). Propuesta de verificación de los parámetros de calibración para un espectrofotómetro visible HACH DR2700 [Universidad De El Salvador]. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. (Vol. 7, Issue 1). [http://www.nostarch.com/javascriptforkids%0Ahttp://www.investopedia.com/terms/i/in_specie.asp%0Ahttp://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/35612/1/Trabajo de Titulacion.pdf%0Ahttps://educacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/01/GUIA-METODOL](http://www.nostarch.com/javascriptforkids%0Ahttp://www.investopedia.com/terms/i/in_specie.asp%0Ahttp://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/35612/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf%0Ahttps://educacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/01/GUIA-METODOL)

Hereña, C. J., & Melo, I. S. (2018). “*EL ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE Y SU UTILIZACIÓN EN EL ANALISIS DE COBRE*” [Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión]. [http://repositorio.undac.edu.pe/bitstream/undac/424/1/Tesis de Cesar Hereña.pdf](http://repositorio.undac.edu.pe/bitstream/undac/424/1/Tesis%20de%20Cesar%20Here%C3%91a.pdf)

Hernández, F. J., Recalde, V. E., & Erazo, A. M. (2015). Determinación de congéneres en alcohol extra neutro rectificado empleado en la elaboración de bebidas alcohólicas. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 28. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)28-37](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)28-37)

Herrera, J. (2020). Validación y estimación de incertidumbre de un método analítico para cuantificar hierro total por el método colorimétrico de la fenantrolina en agua potable y natural. *Revista Científica de FAREM-Estelí*, 34, 154–168. <https://doi.org/10.5377/farem.v0i34.10014>

INEN-ISO 5725-3. (2014). *EXACTITUD (VERACIDAD Y PRECISIÓN) DE LOS MÉTODOS Y RESULTADOS DE LAS MEDICIONES – PARTE 3*.

MEDICIONES INTERMEDIAS DE LA PRECISIÓN DE UN MÉTODO NORMALIZADO DE MEDICIÓN (ISO 5725-3:1994, IDT).
https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/NTE_INEN_ISO_5725_3.pdf

INEN. (2013). *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1084 : 1984. Bebidas gaseosas. Determinación de cafeína.*
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1081-C.pdf>

INEN 1101, N. (2017). *Bebidas Gaseosas o Carbonatadas. Requisitos.* In *Bebidas Gaseosas O Carbonatadas. Requisitos.*
https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1101-4.pdf

Loaiza, B. I. (2018). "*Validación del método de determinación de fluoruros en aguas naturales, residuales y residuales tratadas bajo la NMX-AA-077- SCFI-2001*" [Universidad Tecnológica Del Centro De Veracruz].
<http://189.240.194.249/bitstream/123456789/430/1/6923.pdf>

Lòpez, E. P., & Murillo, C. B. (2017). Evaluación de tres métodos para la recuperación de metales pesados en fertilizantes. *UNED Research Journal*, 9(2), 10.
<https://doi.org/10.22458/urj.v9i2.1666>

Maroto, A. S. (2002). Incertidumbre en métodos analíticos de rutina [Universidad Rovira y Virgili]. In *Universitat Rovira I Virgili*.
https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8987/tesis_Alicia_Maroto.PDF?sequence=1

Marroquín, J. M. (2015). "*Validación del método analítico para la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad d* [Universidad De San Carlos De Guatemala]. <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1391.pdf>

Mazdeh, F. Z., Moradi, Z., Moghaddam, G., Moradi-Khatoonabadi, Z., Aftabdari, F. E., Badaei, P., & Hajimahmoodi, M. (2016). Determination of synthetic food colors, caffeine, sodium benzoate and potassium sorbate in sports drinks. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1), 183–188.

<https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i1.25>

Meteoclim. (2016). *Fenómenos Ópticos Atmosféricos*.

<https://blog.meteoclim.com/fenomenos-opticos-atmosfericos>

Miller, J. C., & Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica-Cuarta Edición. In P. Hall (Ed.), *Prentice Hall* (Cuarta Edición, p. 113).

<https://sceqa.files.wordpress.com/2012/05/quimica-y-quimiometria.pdf>

Morillas, P. P., Ellison, S. L., Lund, U. O., Muller, H. T., & Omeroglu, P. Y. (2014).

La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. In *Guia Eurachem: Vol. Segunda Ed* (Issue 6). <https://doi.org/10.1055/s-2006-961117>

Morillo, K. V. (2016). *Consumo de azúcares libres a través de bebidas azucaradas comerciales de una población de 800 ecuatorianos desde septiembre del 2014 hasta marzo del 2015*. Universidad San Francisco De Quito USFQ.

NTE INEN-CODEX 192. (2013). Norma General Del Códex Para Los Aditivos Alimentarios (Mod). In *Pagina Web*. <http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/ACTUALIZACION/04112014/192-CODEX-UNIDO.pdf>

NTE INEN 2411. (2015). Bebidas Energéticas. Requisitos. In *Norma Técnica Ecuatoriana INEN- 2411*.

https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2411.pdf

ONA, D. D. A. L. (2019). *CRITERIOS PARA LA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN DE ACUERDO A LA NORMA NP- ISO/IEC 17025* (Vol. 08).

https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/upload_editores/u8/CRI008-Criterios-Acr-Lab-Ens-Cal-ISO-17025 Rev. 08 Vig.24-04-19.pdf

Paisan, Y. P., & Moret, J. P. (2008). *Introducción Fundamentación teórica Métodos utilizados y condiciones experimentales*. XXVIII(3), 56–62.

<file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/1899-Texto del artículo-6836-1-10-20161215.pdf>

- Pérez, M. del M. (2012). Estimación de incertidumbres. Guía GUM. *Revista Española de Metrología*, 114,130. http://www.uv.es/~meliajl/Docencia/WebComplementarios/GuiaGUM_e_mediada.pdf
- Plá, A., García, A., Gonzáles, H., Ferrari, C., Olmedo, M., Rodriguez, J., Castellano, L., Demassi, P., Furtado, F., & Couture, E. (2017). *Relevamiento del uso y comercialización de cafeína en territorio nacional*. [https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/2015-2016 - Informe Relevamiento Cafeina - accesible_0.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/2015-2016_-_Informe_Relevamiento_Cafeina_-_accesible_0.pdf)
- Portuondo, Y. P., & Portuondo, J. M. (2010). La Repetibilidad Y Reproducibilidad En El Aseguramiento De La Calidad De Los Procesos De Medición. *Tecnología Química*, 30(2), 117–121. <https://doi.org/10.1590/2224-6185.2010.2.%x>
- Pou, P. T. (2019). *UTILIZACIÓN DE ADITIVOS EN LAS BEBIDAS REFRESCANTES* [Universidad Complutense]. [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PILAR POU TORRES.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PILAR%20POU%20TORRES.pdf)
- Quishpe, M. L. (2017). *VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE SILICIO ASIMILABLE EN SUELOS MEDIANTE ABSORCIÓN ATÓMICA EN LA EMPRESA AGROCALIDAD* (Issue Figura 1) [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/11532/1/T-UCE-0017-0037-2017.pdf>
- Ramos, R. J. (2014). *“OPTIMIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN COCA-COLA ZERO”* [Universidad Mayor de San Andrés]. <https://docplayer.es/94932484-Universidad-mayor-de-san-andres-facultad-de-tecnologia-carrera-de-quimica-industrial.html>
- Ravelo, A. A., Rubio, C. A., Soler, A. C., Casas, C. G., Casas, E. G., Gutiérrez, Á. F., Revert, C. G., & Hardisson, A. de la T. (2012). Consumo de bebidas energizantes en universitarios. In *Robotic Radiosurgery: Treating Prostate Cancer and*

Related Genitourinary Applications (Vol. 19, Issue 4).
https://doi.org/10.1007/978-3-642-11495-3_6

Remache, A. M. (2013). “*VALIDACIÓN DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE METALES EN DIFERENTES MATRICES POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA*”. [Universidad Central Del Ecuador].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1859/1/T-UCE-0017-39.pdf>

Rivera, C. A., & Rodriguez, M. del R. (2010). *USO DE LA ECUACIÓN DE HORWITZ EN LABORATORIOS DE ENSAYOS NMX-EC-17025-IMNC-2006*.
<https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>

Rodríguez, J. R., Escalona, J. C., Rodríguez, R. R., & Rodríguez, Y. B. (2011). VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN EL EXTRACTO FLUIDO DE *Tamarindus indica* L. *Revista Cubana de Química*, XXIII(1), 42–50. <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543722006.pdf>

Rodríguez, S. G. (2019). *DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DI(2-ETILHEXIL) ADIPATO EN AGUAS SUPERFICIALES DEL LAGO YPACARAÍ* [Universidad Nacional De Asunción].
https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Sergio_Rodriguez-Tesis.pdf

Romera, J. L. (2019). *BEBIDAS ENERGÉTICAS : ¿ MEJORAN EL RENDIMIENTO ?* [Universidad Oberta de Catalunya].
<http://openaccess.uoc.edu/webapps/o2/bitstream/10609/109946/6/jromerasTFM1019memoria.pdf>

Ruiz, O. M. (2014). “*Verificaciòn de desempeño de instrumentos empleados en control de calidad.*” Universidad Nacional de Trujillo.

Ruiz, Y. R., & Paizano, M. D. (2016). *Validación Del Método Espectrofotométrico Uv- Visible Para La Cuantificación Y Disolución De Tinidazol Tableta De 500 Mg , En El Laboratorio Nacional De Control De Calidad De M* [Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua].
<https://repositorio.unan.edu.ni/2542/1/47721.pdf>

- SAE, G. B. (2019). *LABORATORIO DEL PROGRAMA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS – PROTAL DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL - ESPOL*. <https://www.acreditacion.gob.ec/wp-content/uploads/2019/02/SAE-LEN-05-009.pdf>
- Salcedo, G. M., Kupski, L., Degang, L., Marube, L. C., Caldas, S. S., & Primel, E. G. (2019). Determination of fifteen phenols in wastewater from petroleum refinery samples using a dispersive liquid—liquid microextraction and liquid chromatography with a photodiode array detector. *Microchemical Journal*, *146*, 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.075>
- Savina, L. V. (2017). *Validacion E Incertidumbre Del Metodo Normalizado Para Ion Nitrito En Agua* [Universidad Nacional de Cuyo]. https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/9888/tesis-brom.-savina-laura-2017.pdf
- Scientific, T. F. (2009). *Evolution 60S User Guide*. <https://www.lebonheur.org/research/investigator-resources/manuals/Thermo Scientific Evolution 60S Spectrophotometer manual.pdf>
- Segovia, J. K. (2016). *Efecto de la aplicación de un impuesto sobre el consumo de bebidas azucaradas en Ecuador como estrategia para combatir la obesidad y el sobrepeso*. [Universidad de Cuenca]. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24352/1/tesis.pdf>
- Socarras, J. S., & Pretelt, F. M. (2020). *Validación del método analítico para la determinación de nitritos en agua natural y potable, por espectrofotometría visible en el laboratorio de investigación y calidad ambiental del centro de comercio, industria y turismo del Sena, regional Córdoba* [Universidad De Córdoba]. https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3041/Pretelt_y_Socarras..pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Thermo Scientific. (2015). *Thermo Scientific SPECTRONIC Certified Standards “Low-cost, traceable standards and filters for routine performance verification*

of UV-Visible spectrophotometers.” https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CAD/Specification-Sheets/PS50452-Spectronic-Standards.pdf?_ga=2.187634991.623083281.1638802202-1844993468.1637542460

Torres, K. J. (2018). *VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA EL ANALISIS DE P2O5 EN CÍA. MINERA MISKIMAYO S.R.L.* [Universidad Nacional de Piura]. <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1467/QUI-TOR-VIL-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Torrico, L. R. (2020). *CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA EN BEBIDAS ENERGIZANTES EXPEDIDAS EN SUPERMERCADOS EN LA CIUDAD DE LA PAZ POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN* [Universidad Mayor De San Andrés]. [http://www.zonaeconomica.com/analisis-financiero/cuentas-cobrar%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/290/29012059009.pdf%0Ahttps://www.faeditorial.es/capitulos/gestion-morosidad.pdf%0Ahttps://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/institution/DCSBA/Bloque 1/NA/02/N](http://www.zonaeconomica.com/analisis-financiero/cuentas-cobrar%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/290/29012059009.pdf%0Ahttps://www.faeditorial.es/capitulos/gestion-morosidad.pdf%0Ahttps://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/institution/DCSBA/Bloque%201/NA/02/N)

Valdez, L. S., Gonzáles, S. M., & Benavides, A. M. (2015). Ácido Benzoico: Biosíntesis, Modificación Y Función En Plantas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1667–1678. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i7.560>

Valverde, A. A. (2018). Producción de bebidas azucaradas a partir de la ley orgánica para el equilibrio de las finanzas públicas. In *Instituto de altos estudios nacionales universidad de postgrado del estado* (Vol. 0, Issue 0). Universidad de postgrado del Estado.

Vanegas, H. S., & López, Y. J. (2018). *Influencia Del Tipo De Conservante En La Conservación Del Ají De Leche* [Universidad Laica “Eloy Alfaro” De Manabi]. <https://repositorio.ulead.edu.ec/bitstream/123456789/1728/1/ULEAM-IAL-0033.pdf>

Villeda, J. J. (2010). Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria [Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. In *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/456/61581s.pdf?sequence=1>

ANEXOS

ANEXO 1. Verificación del espectrofotómetro en rango visible.

Longitud de onda (nm)	3 % T	Repeticiones %T obtenidos	Promedio %T	%T sugerida	Resultados	Repeticiones de (Abs) obtenido	Promedio Abs	(Abs) sugerida	Resultado
440	3	2,26	2,12	2,10	acepta	1,676	1,676	1,675	acepta
		2,09				1,665			
		2,00				1,686			
456	3	2,92	2,92	2,90	acepta	1,534	1,540	1,527	acepta
		2,93				1,538			
		2,90				1,549			
546	3	2,90	2,89	2,80	acepta	1,567	1,556	1,549	acepta
		3,07				1,549			
		2,70				1,553			
590	3	2,49	2,41	2,40	acepta	1,666	1,677	1,624	acepta
		2,40				1,700			
		2,35				1,664			
635	3	2,92	2,96	2,90	acepta	1,535	1,539	1,510	acepta
		3,03				1,565			
		2,93				1,518			

Figura 16. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 3% T para el rango visible.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

Longitud de onda (nm)	10 % T	Repeticiones %T obtenidos	Promedio %T	%T sugerida	Resultados	Repeticiones de (Abs) obtenido	Promedio Abs	(Abs) sugerida	Resultado
440	10	7,49	7,42	7,40	acepta	1,141	1,142	1,129	acepta
		7,20				1,142			
		7,55				1,143			
456	10	9,36	9,39	9,30	acepta	1,043	1,043	1,031	acepta
		9,45				1,043			
		9,36				1,043			
546	10	8,98	9,04	9,00	acepta	1,055	1,055	1,045	acepta
		9,18				1,055			
		8,97				1,055			
590	10	8,05	8,10	8,00	acepta	1,106	1,105	1,095	acepta
		8,27				1,105			
		7,99				1,105			
635	10	9,67	9,66	9,60	acepta	1,031	1,030	1,019	acepta
		9,54				1,030			
		9,76				1,029			

Figura 17. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 10 % T para el rango visible.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

Longitud de onda (nm)	30 % T	Repeticiones %T obtenidos	Promedio %T	%T sugerida	Resultados	Repeticiones de (Abs) obtenido	Promedio Abs	(Abs) sugerida	Resultado
440	30	26,94	26,92	26,90	acepta	0,573	0,573	0,570	acepta
		26,87				0,572			
		26,94				0,573			
456	30	33,01	33,06	30,00	acepta	0,481	0,481	0,478	acepta
		33,06				0,481			
		33,12				0,480			
546	30	34,13	34,15	30,00	acepta	0,467	0,467	0,466	acepta
		34,16				0,466			
		34,15				0,467			
590	30	31,38	31,37	30,00	acepta	0,503	0,503	0,503	acepta
		31,33				0,504			
		31,41				0,503			
635	30	30,91	30,91	30,00	acepta	0,510	0,510	0,509	acepta
		30,93				0,510			
		30,88				0,510			

Figura 18. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 30 % T para el rango visible.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

Longitud de onda (nm)	50 % T	Repeticiones %T obtenidos	Promedio %T	%T sugerida	Resultados	Repeticiones de (Abs) obtenido	Promedio Abs	(Abs) sugerida	Resultado
440	50	45,23	45,60	45,50	acepta	0,345	0,344	0,342	acepta
		46,32				0,344			
		45,24				0,344			
456	50	51,78	51,74	50,00	acepta	0,286	0,286	0,285	acepta
		51,69				0,287			
		51,75				0,286			
546	50	52,43	52,51	50,00	acepta	0,280	0,283	0,280	acepta
		52,60				0,279			
		52,49				0,290			
590	50	50,31	50,32	50,00	acepta	0,298	0,298	0,298	acepta
		50,35				0,298			
		50,29				0,299			
635	50	50,62	50,60	50,00	acepta	0,296	0,299	0,297	acepta
		50,56				0,296			
		50,62				0,306			

Figura 19. Datos obtenidos de absorbancia y transmitancia al usar celdas al 50 % T para el rango visible.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

ANEXO 2. Verificación del espectrofotómetro en rango ultravioleta.

Control de longitud de onda de espectrofotómetro UV-Vis												
Longitud de onda de referencia (nm)	Mínimo (nm)	Máximo (nm)	Concentración		Absorbancia			A 1%/1cm			Promedio	Criterio de aceptación
					I	II	III	I	II	III		
430	15,7	16,1	600,6	0,6006	0,953	0,955	0,957	15,87	15,90	15,93	15,90	acepta
350	105,6	109	60,06	0,06006	0,635	0,637	0,635	105,73	105,73	105,73	105,73	acepta
313,00	47,00	50,30	60,06	0,06006	0,301	0,299	0,300	50,12	49,95	49,95	50,01	acepta
257,00	142,80	146,20	60,06	0,06006	0,870	0,869	0,871	144,86	145,02	145,02	144,97	acepta
235,00	122,90	126,20	60,06	0,06006	0,743	0,749	0,744	123,71	123,88	123,88	123,82	acepta

Figura 20. Datos obtenidos de transmitancia al usar celdas de holmio rango ultravioleta.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

Control de absorbancia de espectrofotómetro UV-Vis												
Longitud de onda de referencia (nm)	Mínimo (nm)	Máximo (nm)	Concentración		Absorbancia			A 1%/1cm			Promedio	Criterio de aceptación
					I	II	III	I	II	III		
430	15,7	16,1	600,6	0,6006	0,933	0,960	0,975	15,53	15,98	16,23	15,92	acepta
350	105,6	109	60,06	0,06006	0,670	0,660	0,645	111,56	107,39	107,39	108,78	acepta
313,00	47,00	50,30	60,06	0,06006	0,301	0,289	0,297	50,12	49,45	49,45	49,67	acepta
257,00	142,80	146,20	60,06	0,06006	0,890	0,854	0,845	148,19	140,69	140,69	143,19	acepta
235,00	122,90	126,20	60,06	0,06006	0,763	0,784	0,750	127,04	124,88	124,88	125,60	acepta

Figura 21. Datos obtenidos de transmitancia al usar soluciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con diferentes concentraciones, para rango ultravioleta.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

Control de la dispersión de la luz espectrofotómetro UV-Vis							
Longitud de onda de referencia (nm)	Mínimo (nm)	Máximo (nm)	%T			promedio	criterio de aceptación
			I	II	II		
198	0	0,9999	0,350	0,399	0,420	0,389667	acepta

Figura 22. Datos obtenidos de transmitancia al usar solución de cloruro de potasio (KCl), para el rango ultravioleta.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

ANEXO 3. Curva de calibración.

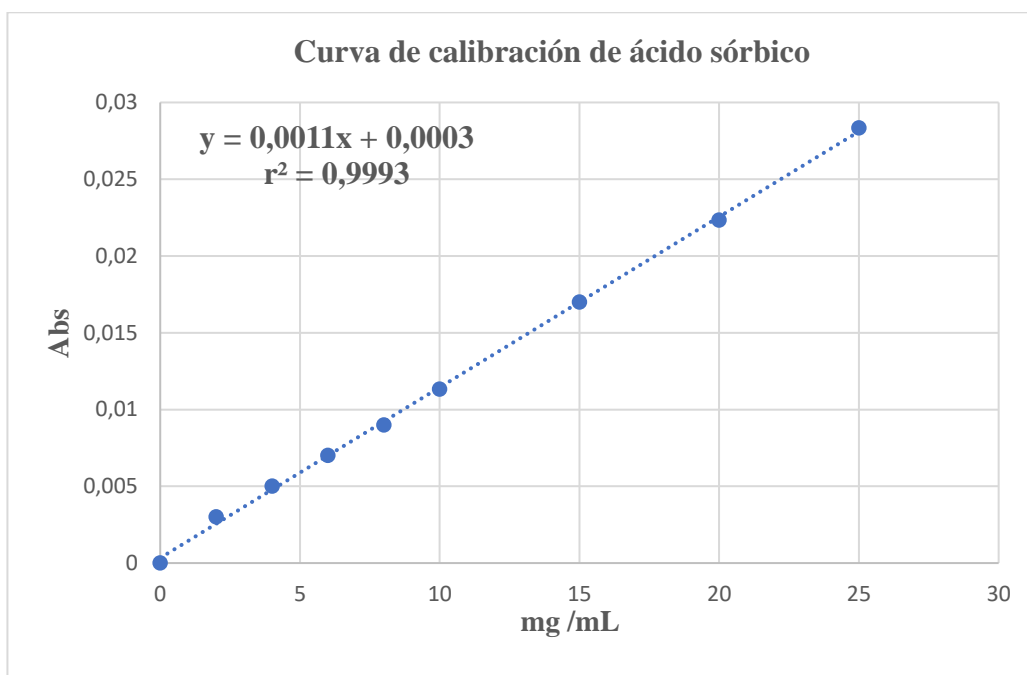


Gráfico 1. Curva de calibración de ácido sórbico

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

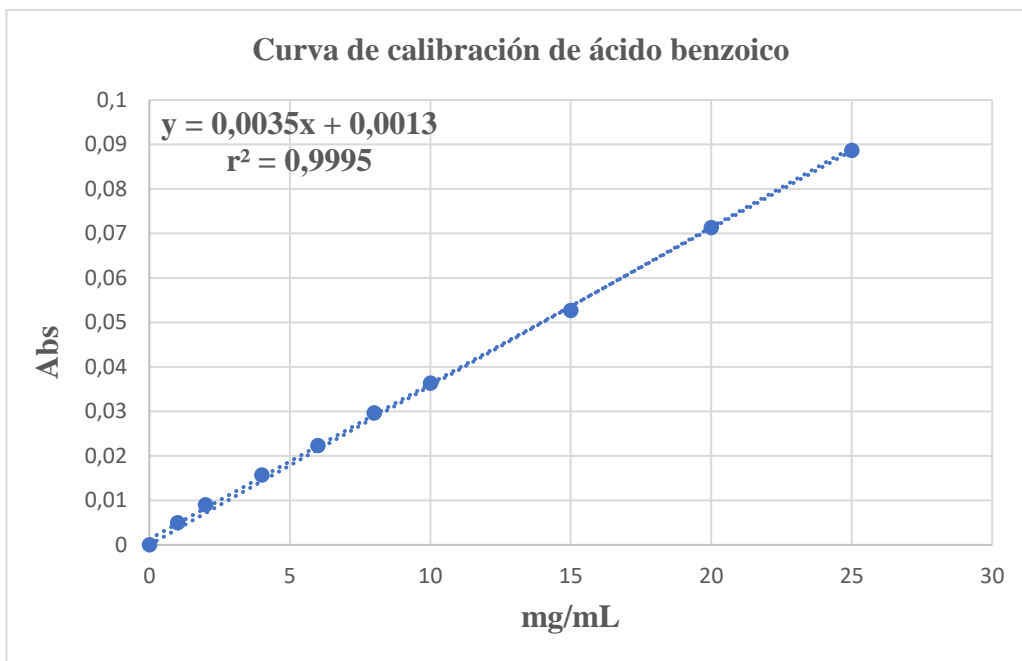


Gráfico 2. Curva de calibración de ácido sórbico

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

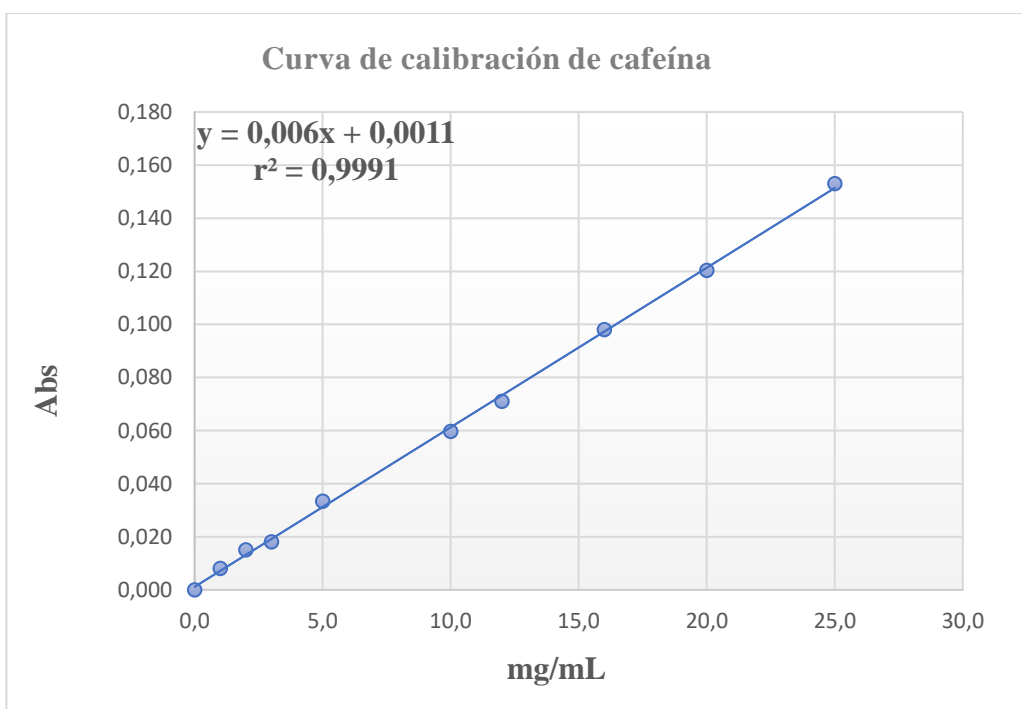


Gráfico 3. Curva de calibración de cafeína.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

ANEXO 4. Comparación de las pendientes

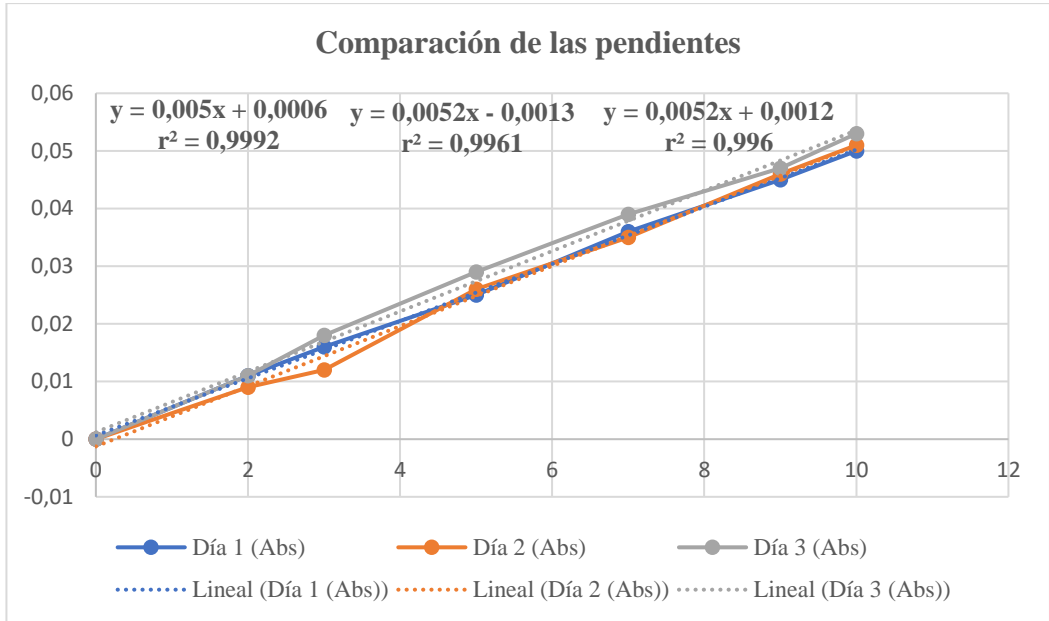


Gráfico 4. Pendientes en muestra de coca cola light con analito de ácido sórbico

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

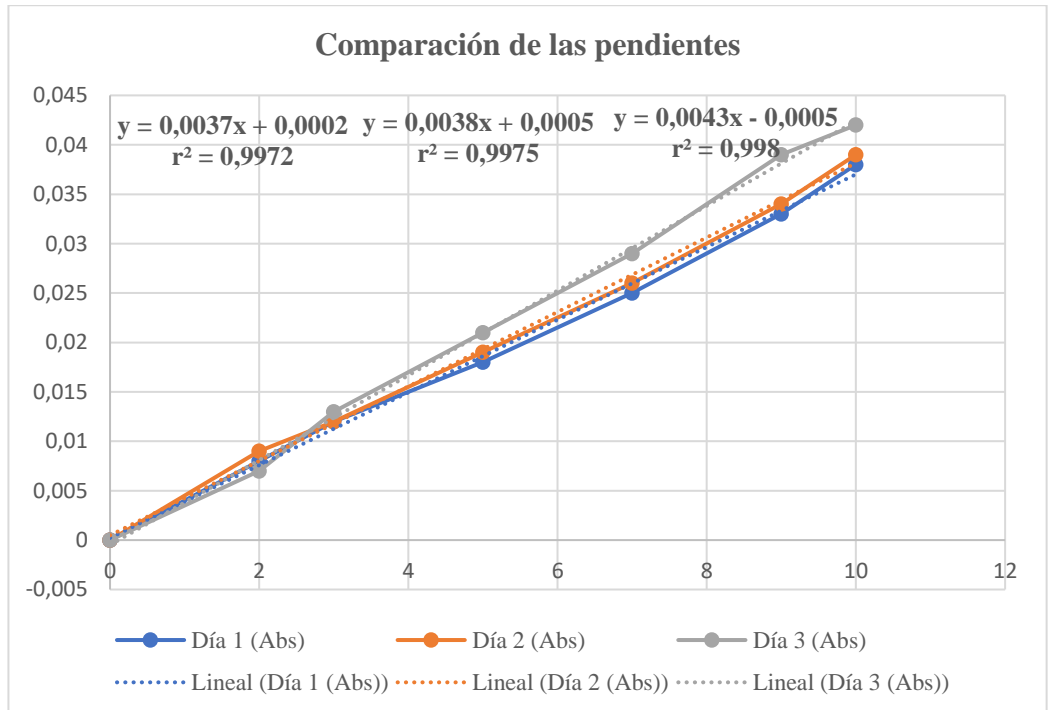


Gráfico 5. Pendientes en muestra de coca cola light con analito de ácido benzoico.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

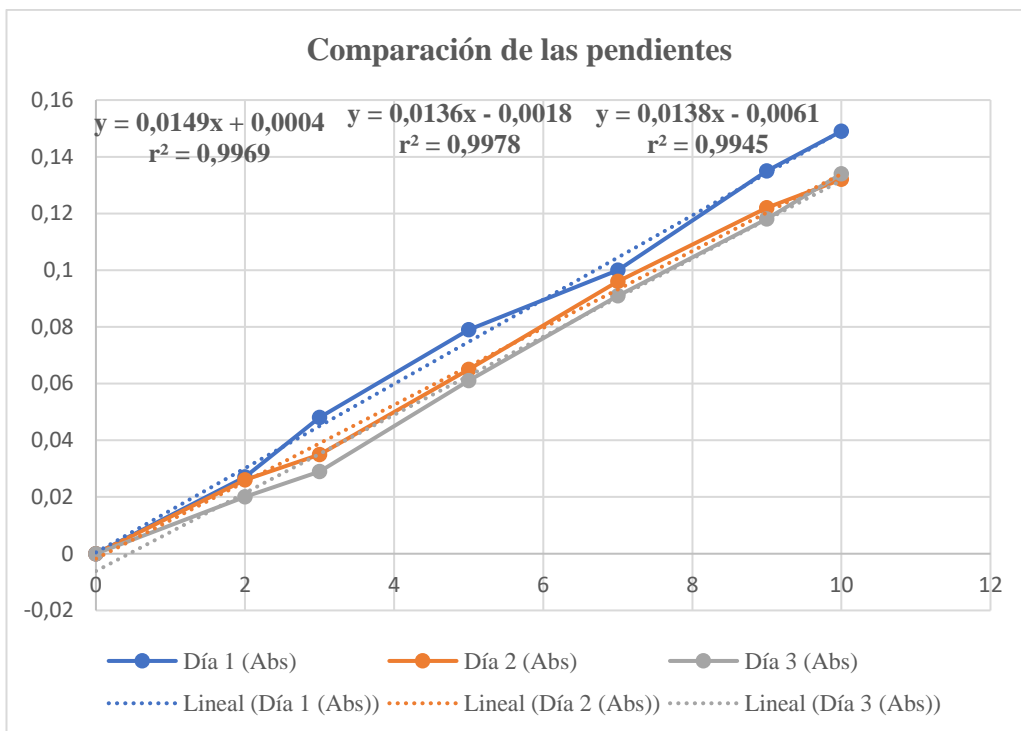


Gráfico 6. Pendientes en muestra de coca cola light con analito de cafeína.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

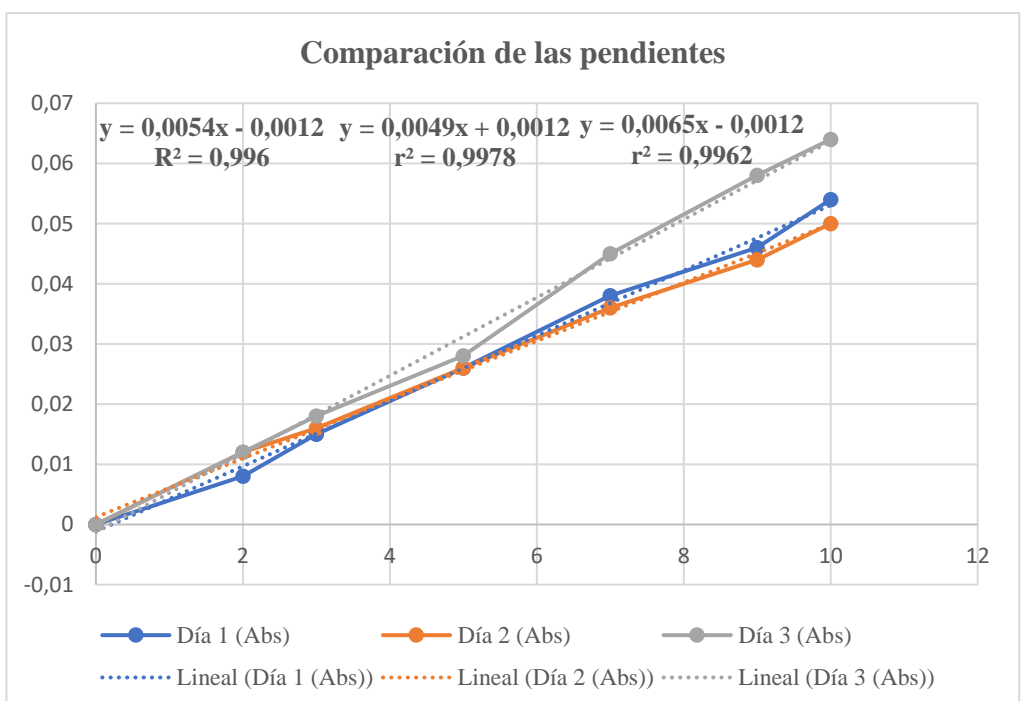


Gráfico 7. Pendientes en muestra de 220V con analito de ácido sórbico.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

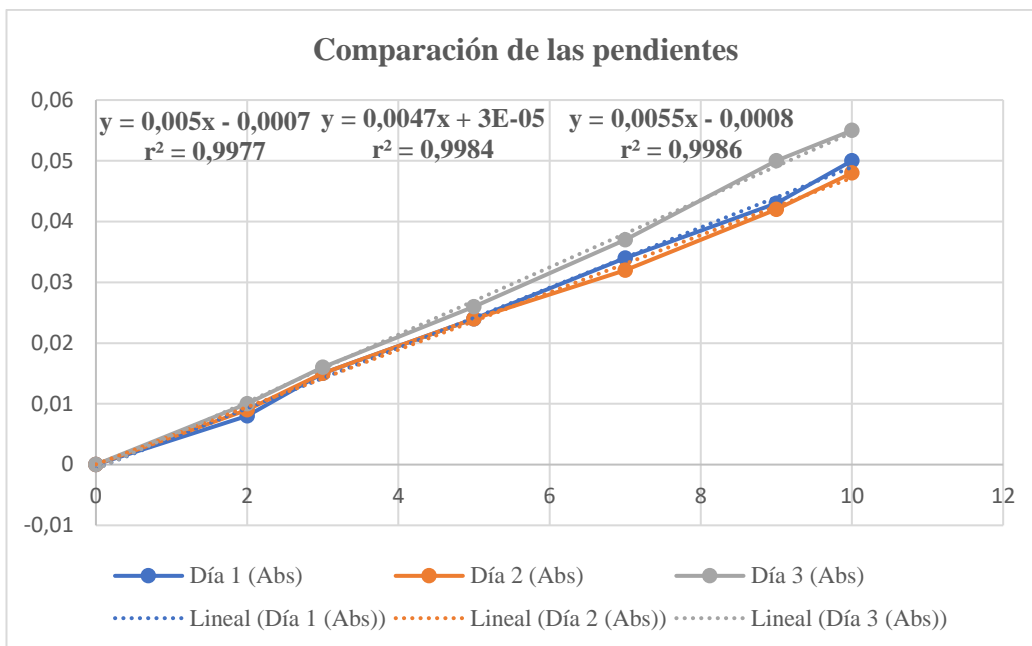


Gráfico 8. Pendientes en muestra de 220V con analito de ácido benzoico.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

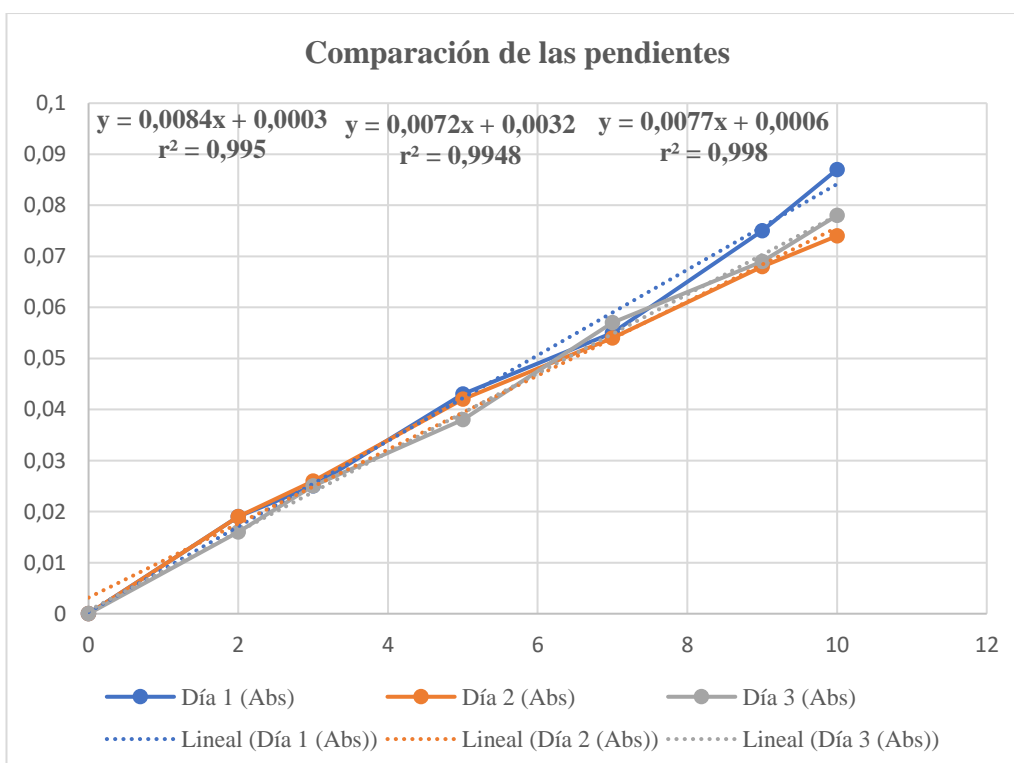


Gráfico9. Pendientes en muestra de 220V con analito de cafeína.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

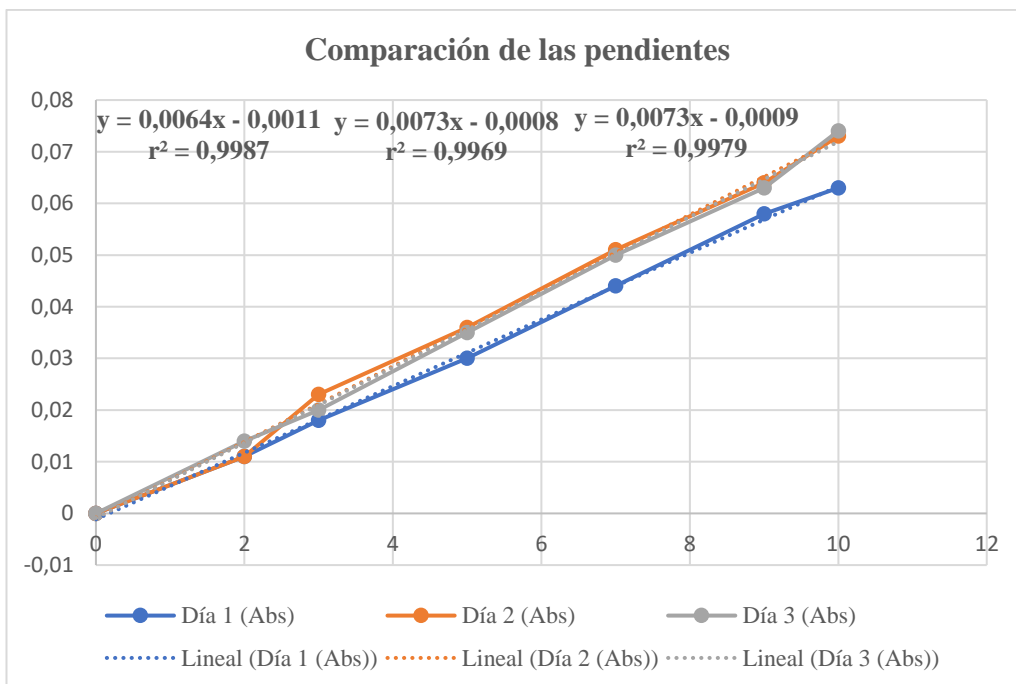


Gráfico 10. Pendientes en muestra de Monster con analito de ácido sórbico.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

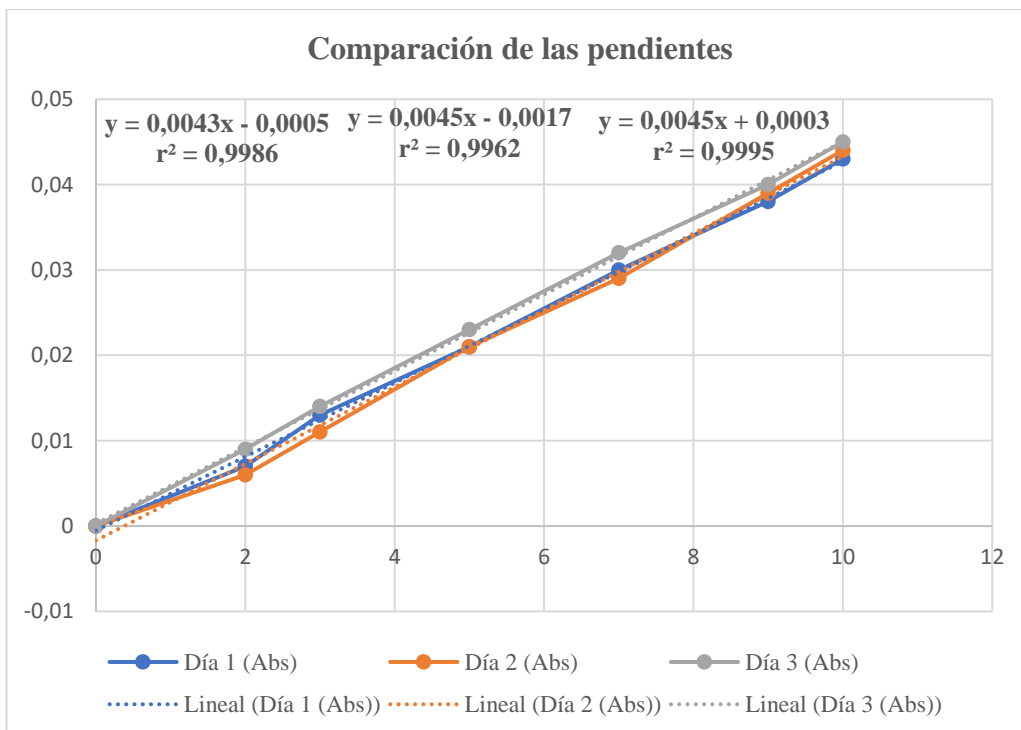


Gráfico 11. Pendientes en muestra de Monster con analito de ácido benzoico.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)

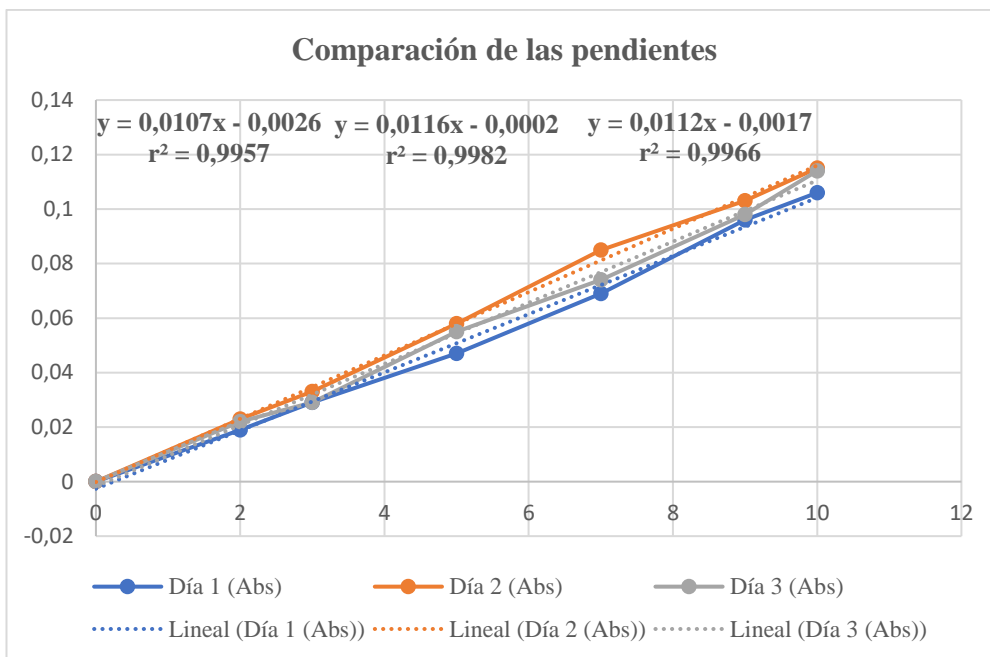


Gráfico 12. Pendientes en muestra de Monster con analito de cafeína.

Elaborado por: Ojeda S. (2021)