

Cuantificación de aditivos conservantes en mermeladas comerciales de guayaba mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Quantification of preservative additives in commercial guava jams by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Julio César Benítez-Villalba^{1,*}, Paola Cárdenas Fischer¹, Oscar Daniel Cristaldo-López¹,
Liliana Antonia Arrúa-Martínez¹ & Nadia Mabel Villalba-Villalba¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Grupo de Investigación “Química y sus Aplicaciones en las Ciencias de la Vida” (QuiViDa), Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor de correspondencia: juliobenitez@facen.una.py.

Resumen: El benzoato de sodio y el sorbato de potasio son aditivos ampliamente utilizados como conservantes en alimentos procesados, debido a su eficacia para prevenir alteraciones microbiológicas como la fermentación, el enmohecimiento y la putrefacción. De acuerdo con el Codex Alimentarius, el límite máximo permitido para cada uno de estos aditivos en productos como las mermeladas es de 1000 mg/kg, equivalente a 100 mg/100 g. En el presente estudio se desarrolló, validó y aplicó un método basado en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación simultánea de ambos conservantes en cinco muestras comerciales de mermeladas de guayaba adquiridas en Paraguay. La validación intralaboratorio, realizada conforme a los lineamientos de la guía ICH Q2(R1), demostró excelente linealidad en el rango de trabajo ($R^2 = 0,999$ para ambos analitos), así como alta sensibilidad, con límites de detección (LOD) de 0,15 mg/L para benzoato de sodio y 0,18 mg/L para sorbato de potasio, y límites de cuantificación (LOQ) de 0,45 mg/L y 0,54 mg/L, respectivamente. La metodología evidenció adecuada precisión, reproducibilidad y selectividad para su aplicación en matrices alimentarias complejas. Su aplicación a muestras comerciales permitió cuantificar ambos conservantes en un rango de 19,05 a 153,59 mg/100 g para benzoato de sodio y desde valores inferiores al límite de detección hasta 95,13 mg/100 g para sorbato de potasio, observándose que dos de las muestras analizadas presentaron concentraciones de benzoato superiores al límite establecido. Los resultados confirman la utilidad del método cromatográfico validado como una herramienta analítica confiable para la evaluación composicional de productos procesados y como soporte técnico en actividades de control de calidad y aseguramiento analítico en la industria alimentaria.

Palabras clave: *Aditivos alimentarios, Conservantes, Mermeladas comerciales, Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).*

Abstract: Sodium benzoate and potassium sorbate are widely used food additives employed as preservatives in processed foods due to their effectiveness in preventing microbiological alterations such as fermentation, mold growth, and spoilage. According to the Codex Alimentarius, the maximum permitted level for each of these additives in products such as jams is 1000 mg/kg, equivalent to 100 mg/100 g. In the present study, a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was developed, validated, and applied for the simultaneous quantification of both preservatives in five commercial guava jam samples acquired in Paraguay. Intralaboratory validation, performed in accordance with the ICH Q2(R1) guideline, demonstrated excellent linearity within the working range ($R^2 = 0.999$ for both analytes), as well as high sensitivity, with limits of detection (LOD) of 0.15 mg/L for sodium benzoate and 0.18 mg/L for potassium sorbate, and limits of quantification (LOQ) of 0.45 mg/L and 0.54 mg/L, respectively. The methodology showed adequate precision, reproducibility, and selectivity for application in complex food matrices. Its application to commercial samples enabled the quantification of both preservatives within a range of 19.05 to 153.59 mg/100 g for sodium benzoate and from below the detection limit to 95.13 mg/100 g for potassium sorbate, with two samples presenting sodium benzoate concentrations exceeding the established regulatory limit. These results confirm the usefulness of the validated chromatographic method as a reliable analytical tool for the compositional evaluation of processed food products and as technical support for quality control activities and analytical assurance in the food industry.

Keywords: *Food additives, Preservatives, Commercial jams, High-performance liquid chromatography (HPLC).*

Introducción

Los aditivos alimentarios son sustancias que, sin constituir en sí mismas un alimento ni un ingrediente habitual, se incorporan de forma controlada durante los procesos de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento de alimentos con fines tecnológicos, incluyendo mejoras organolépticas. Su uso da lugar, de forma directa o indirecta, a la presencia de residuos o compuestos en el alimento final que pueden modificar sus características (Codex Alimentarius, 2023). Esta definición excluye a los contaminantes y a las sustancias añadidas con fines nutricionales.

Entre los aditivos alimentarios más utilizados se encuentran los conservantes, cuyo propósito es prevenir alteraciones microbiológicas, tales como la fermentación, el enmohecimiento y la putrefacción. Su empleo se ha incrementado en las últimas décadas debido a las importantes pérdidas económicas asociadas al deterioro microbiano de los alimentos, así como a los riesgos sanitarios que implican los productos alterados para el consumidor final. En este sentido, la actividad metabólica de bacterias, mohos y levaduras constituye uno de los principales factores responsables del deterioro de alimentos procesados, lo que ha impulsado el desarrollo y la optimización de tecnologías de conservación más eficaces (Jay *et al.*, 2005).

Los conservantes químicos actúan inhibiendo el desarrollo de microorganismos, especialmente hongos y levaduras. Entre los más utilizados en la industria alimentaria destacan el benzoato de sodio y el sorbato de potasio. El benzoato de sodio ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$) es una sal del ácido benzoico (Fig. 1) que inhibe el crecimiento de levaduras, mohos y algunas bacterias, siendo más eficaz en medios ácidos ($\text{pH} < 4$). Su actividad antimicrobiana se debe a su capacidad para interferir en el metabolismo enzimático microbiano (Kirk *et al.*, 2004). Se emplea habitualmente en conservas, bebidas carbonatadas, aderezos, zumos y mermeladas (Casp & Requena, 2003). Diversos estudios han indicado que el benzoato de sodio y sus sales presentan baja toxicidad a las concentraciones comúnmente empleadas en

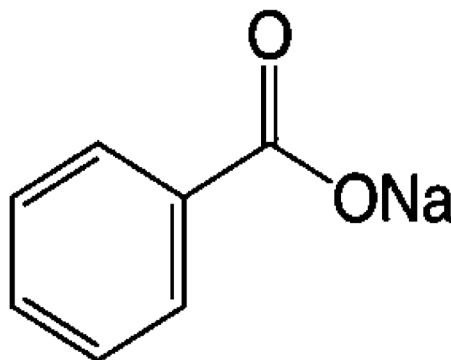


Figura 1. Estructura molecular del benzoato de sodio.

alimentos, ya que son rápidamente metabolizados en el organismo. No obstante, se ha reportado la posible formación de benceno un compuesto clasificado como carcinogénico cuando el benzoato interactúa con ácido ascórbico bajo determinadas condiciones, tales como pH ácido, exposición a la luz y temperaturas elevadas (McNeal *et al.*, 2010; Gardner & Lawrence, 2014). Estas observaciones han motivado un mayor control regulatorio y el desarrollo de estrategias tecnológicas orientadas a minimizar este riesgo en productos alimentarios y bebidas.

Por su parte, el sorbato de potasio (E-202), sal del ácido sórbico (Fig. 2), es ampliamente utilizado como conservante debido a su eficacia frente a hongos y levaduras, su alta solubilidad y su bajo impacto toxicológico. Este aditivo ha sido clasificado como generalmente reconocido como seguro (GRAS, por su sigla en inglés, *Generally Recognized as Safe*) por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, y su uso también ha sido evaluado y autorizado por organismos internacionales como la FAO y la OMS para diversas aplicaciones alimentarias, incluyendo productos sometidos a altas temperaturas, como las mermeladas (FAO & WHO, 2020). Su eficacia

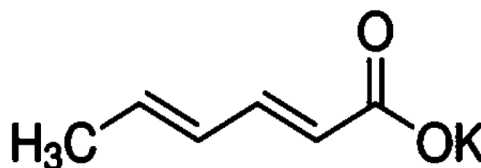


Figura 2. Estructura molecular del sorbato de potasio.

se ve limitada frente a ciertas bacterias, y aunque generalmente es bien tolerado por el organismo, puede generar reacciones químicas no deseadas al interactuar con otros aditivos, como los nitritos, con los que puede formar compuestos potencialmente carcinógenos como el ácido etilnitroso (ENA) (Lück & Jager, 1995).

Ambos conservantes están regulados internacionalmente. El Codex Alimentarius establece un límite máximo de uso de 1000 mg/kg, equivalente a 100 mg/100 g tanto para el benzoato de sodio como para el sorbato de potasio en productos como las mermeladas (Codex Alimentarius, 2023).

En este estudio se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de benzoato de sodio y sorbato de potasio en muestras comerciales de mermeladas de guayaba disponibles en el mercado paraguayo, con el fin de verificar si los niveles de estos conservantes cumplen con la normativa vigente y garantizar la inocuidad alimentaria. La estrategia analítica seleccionada ha demostrado ser eficaz y sensible en la cuantificación de conservantes en matrices alimentarias complejas (Benítez-Villalba *et al.*, 2017; Benítez-Villalba *et al.*, 2018), asegurando resultados confiables para el control de calidad y el cumplimiento regulatorio.

Materiales y métodos

Productos químicos y reactivos

En esta investigación se emplearon estándares certificados de benzoato de sodio ($\geq 99\%$, CAS 532-32-1) y sorbato de potasio (E-202, $\geq 99\%$, CAS 24634-61-5), adquiridos respectivamente de las empresas Amigo & Arditi S.A. Además, se utilizaron acetato de amonio de grado analítico (J.T. Baker, Alemania), acetonitrilo de grado cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemania) y agua destilada.

Instrumentación y software

La cuantificación de benzoato de sodio y sorbato de potasio se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un sistema Shimadzu (Japón), modelo DGU-20A5 E, equipado con bomba cuaternaria, inyector automático y de-

TECTORES de fotodiodo (PDA) y fluorescencia (FLD). La adquisición, integración y análisis de los datos cromatográficos se efectuó mediante el software LCsolution.exe, versión 1.0 (Shimadzu, Japón). Las muestras fueron previamente homogenizadas en un baño de ultrasonido NGS. Para la pesada de reactivos y muestras se empleó una balanza analítica RADWAG 310.R2 (Polonia). El tratamiento de los datos se llevó a cabo utilizando Microsoft® Office 2010, aplicando análisis descriptivos de medias y desviaciones estándar.

Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas con el objetivo de lograr una adecuada separación y detección de los analitos. Para el desarrollo y optimización del método cromatográfico se utilizaron soluciones estándar de benzoato de sodio y sorbato de potasio, cada una a una concentración de 50 mg/L, con el fin de ajustar parámetros tales como el tiempo de retención, la resolución entre picos, la composición de la fase móvil y las condiciones de detección. Dadas las propiedades fisicoquímicas de los analitos, se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, donde la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se seleccionó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm $\times$ 4,6 mm; 5 μ m), basada en interacciones hidrofóbicas entre los analitos y la fase estacionaria, adecuada para compuestos de polaridad moderada.

Las variables cromatográficas principales fase móvil, pH, temperatura de la columna y volumen de inyección se optimizaron de manera univariada, seleccionando las condiciones finales según la resolución, simetría de picos y tiempos de retención. Las mermeladas comerciales de guayaba, debido a su alto contenido de azúcares, pectinas y colorantes, constituyen asimismo una matriz compleja, lo que justifica la adaptación del método para lograr una separación eficiente y una cuantificación precisa de los conservantes. (Benítez-Villalba *et al.*, 2024; Benítez-Villalba *et al.*, 2023; Benítez-Villalba *et al.*, 2021; Benítez-Villalba *et al.*, 2022). Estos ensayos respaldarán la robustez y aplicabilidad de la

estrategia analítica utilizada para la cuantificación simultánea de conservantes en alimentos procesados como las mermeladas.

Preparación de las soluciones patrón de benzoato de sodio y sorbato de potasio

Para la preparación de las soluciones patrón madre, se pesaron 100 mg de benzoato de sodio y 100 mg de sorbato de potasio utilizando una balanza analítica. Cada compuesto se disolvió por separado en matraces aforados de 100 mL con agua destilada, obteniéndose así soluciones individuales con una concentración de 1000 mg/L. A partir de las soluciones madre, se prepararon diluciones para obtener soluciones mixtas de trabajo que contenían ambos aditivos simultáneamente. Las diluciones se realizaron en matraces aforados de 50 mL, completando el volumen con la fase móvil, según las proporciones indicadas en la Tabla 1.

En todos los casos, el volumen final fue ajustado a 50 mL con fase móvil, compuesta por 80% de solución buffer de acetato de amonio 20 mM (pH = 4,2) y 20 % de acetonitrilo.

Validación del método analítico de cuantificación

La validación de métodos analíticos es un paso fundamental para garantizar que los resultados obtenidos mediante un procedimiento específico sean confiables, reproducibles y adecuados para el propósito previsto. Para este estudio, se validó el método de cromatografía líquida de alta eficiencia

(HPLC) para la cuantificación simultánea de benzoato de sodio y sorbato de potasio en mermeladas de guayaba, siguiendo los lineamientos propuestos por la International Conference on Harmonisation (ICH, 2005) y las recomendaciones de la AOAC (2016).

Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante la preparación de soluciones patrón que contenían ambos analitos en concentraciones de 1, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 mg/L. Cada concentración fue inyectada por triplicado, y se construyeron curvas de calibración a partir de la relación entre el área del pico cromatográfico y la concentración del analito, siguiendo criterios recomendados en la literatura (Shrivastava & Gupta, 2011).

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

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon siguiendo la ecuación basada en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración, de acuerdo con las recomendaciones de la ICH (2005). Para ello, se realizaron múltiples inyecciones de las soluciones patrón a concentraciones bajas dentro del rango de trabajo del método, permitiendo estimar la variabilidad de la señal y la sensibilidad del sistema. Estos parámetros fueron considerados como indicadores de la capacidad del método para detectar y cuantificar concentraciones mínimas

Tabla 1. Preparación de soluciones mixtas de trabajo de benzoato de sodio y sorbato de potasio.

Concentración final (mg/L)	Volumen de benzoato de sodio (mL)	Volumen de sorbato de potasio (mL)	Volumen de fase móvil hasta 50 mL (mL)
100	5	5	40
50	2,5	2,5	45
40	2	2	46
30	1,5	1,5	47
20	1	1	48
10	0,5	0,5	49
1	0,05	0,05	49,9

de los analitos, garantizando que la técnica sea adecuada para la determinación de conservantes en mermeladas comerciales (FAO/WHO, 2021).

Rango dinámico lineal

El rango dinámico lineal (RDL) se estableció entre 1 y 100 mg/L para ambos analitos. Dentro de este intervalo, la respuesta instrumental mostró una proporcionalidad directa con la concentración del analito, cumpliendo con los criterios de linealidad recomendados por la AOAC (2016), los cuales consideran aceptable un coeficiente de correlación (R^2) superior a 0,99 para métodos de cuantificación de aditivos alimentarios.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad del método se evaluó a partir de la pendiente de las curvas de calibración construidas para cada analito, considerando las soluciones patrón inyectadas en triplicado a distintas concentraciones dentro del rango de trabajo. Este parámetro permitió determinar la capacidad del método para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de benzoato de sodio y sorbato de potasio, garantizando que la técnica sea adecuada para su aplicación en muestras reales de alimentos procesados (Moldoveanu & David, 2015).

Exactitud del método: Precisión y veracidad

La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación y repetibilidad. La recuperación se determinó adicionando cantidades conocidas de benzoato de sodio y sorbato de potasio a una mermelada de guayaba casera libre de conservantes. La precisión se evaluó calculando la desviación estándar relativa (RSD) de medidas repetidas en un mismo día (precisión intradía) y en días consecutivos (precisión interdía), siguiendo los criterios recomendados por EURACHEM (2014). Estos estudios permiten asegurar que el método sea adecuado para la cuantificación de conservantes en alimentos.

Aplicación del método analítico

El método validado se aplicó a cinco muestras

comerciales de mermeladas de guayaba, con el objetivo de evaluar su desempeño en matrices reales (Codex Alimentarius, 2017). Para la preparación de las muestras, se pesaron 10 g de mermelada en un vaso de precipitados de 100 mL y se añadió agua destilada hasta alcanzar un volumen total aproximado de 50 mL.

La mezcla se homogenizó con una varilla de vidrio y se agitó durante 4 minutos utilizando un agitador magnético, seguida de un reposo de 5 minutos para favorecer la sedimentación de partículas insolubles. El sobrenadante acuoso se decantó a través de un embudo con lana de vidrio y se recolectó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. A partir de este extracto, se tomó un volumen de 1 mL, que se aforó hasta 10 mL con la fase móvil, obteniendo la solución lista para el análisis cromatográfico.

Tanto el extracto de las muestras como las soluciones patrón se filtraron mediante un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μm y se recolectaron en viales de inyección, que posteriormente fueron introducidos en el muestreador automático del sistema HPLC bajo las condiciones cromatográficas previamente optimizadas, garantizando la correcta identificación y cuantificación simultánea de benzoato de sodio y sorbato de potasio en las muestras evaluadas.

Resultados y discusión

Optimización de las condiciones cromatográficas

Con el objetivo de lograr una separación eficiente, reproducible y con adecuada resolución de benzoato de sodio y sorbato de potasio, se optimizaron las condiciones cromatográficas del sistema HPLC (Tabla 2). Dado que ambos conservantes presentan características estructurales compatibles con separación en fase reversa, se empleó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm $\times$ 4,6 mm; 5 μm), reconocida por su alta eficiencia en la separación de compuestos orgánicos moderadamente polares.

Durante la optimización se evaluaron tres combinaciones de fase móvil con diferentes proporciones de tampón de acetato de amonio 20 mM (pH 4,2) y acetonitrilo (v/v), seleccionándose

Tabla 2. Condiciones cromatográficas óptimas para la separación simultánea de benzoato de sodio y sorbato de potasio por HPLC.

Parámetro	Condición Optimizada
Tipo de columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm)
Modo de separación	Cromatografía en fase reversa
Fase móvil	Tampón acetato de amonio (pH 4,2): Acetonitrilo (80:20)
Temperatura de columna	30 °C
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda	225 nm
Tiempo de análisis	15 minutos
Tiempo de retención	5,951 min Benzoato de sodio 7,215 min Sorbato de potasio
Detector	DAD
Software de adquisición	LC Solution.exe (versión 1.0)

finalmente la proporción de 80% tampón y 20% acetonitrilo. Esta combinación permitió obtener picos bien definidos, con resolución crítica (*R_s*) de 2,15, simetría de picos entre 0,98 y 1,05, y tiempos de retención promedio de 5,951 ± 0,023 min para el benzoato de sodio y 7,215 ± 0,031 min para el sorbato de potasio, asegurando una separación reproducible y una línea base estable. La elección de un pH ligeramente ácido se fundamentó en las propiedades ácido-base de los analitos; considerando los *pK_a* de 4,2 para el benzoato de sodio y 4,7 para el sorbato de potasio, en estas condiciones ambos compuestos se encuentran predominantemente no ionizados, lo que favorece su retención en la fase reversa y mejora la detectabilidad por absorción UV (Lück & Jager, 1995; Moldoveanu & David, 2015).

La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30 °C y se inyectó un volumen de 20 µL de muestra, ofreciendo una buena sensibilidad sin sobrecargar la columna. La longitud de onda de detección se fijó en 225 nm, correspondiente a los máximos de absorción UV de ambos compuestos. La duración total de la corrida fue de 15 minutos, garantizando eficiencia y aplicabilidad en análisis rutinarios de alimentos.

En la Tabla 2 y la Fig. 3 se resumen las condi-

ciones cromatográficas óptimas y los parámetros evaluados, los cuales fueron fundamentales para garantizar la correcta separación y cuantificación de los analitos en las muestras comerciales de mermeladas.

Validación del método analítico

El método propuesto mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue validado para la cuantificación simultánea de benzoato de sodio y sorbato de potasio en mermeladas de guayaba, siguiendo los lineamientos establecidos por la guía ICH Q2(R1) (2005) y las recomendaciones de la AOAC International (2016). La validación incluyó la evaluación de linealidad, rango dinámico lineal, sensibilidad, límites de detección y cuantificación,

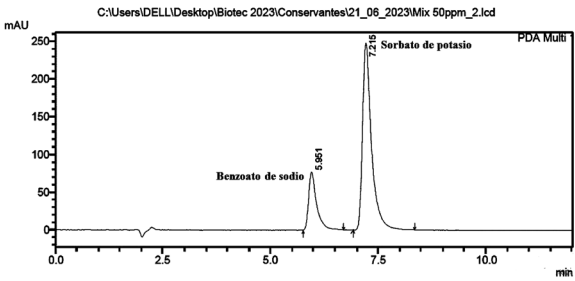


Figura 3. Cromatograma de los conservantes con las condiciones óptimas estándar 50 mg/L.

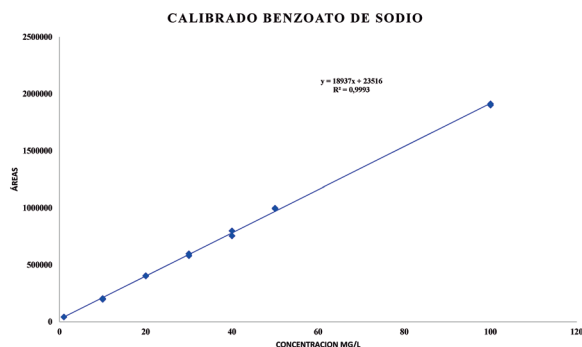


Figura 4. Curva de calibrado del benzoato de sodio.

exactitud, precisión y aplicabilidad a muestras reales.

Para garantizar la confiabilidad del método, se establecieron previamente criterios de aceptación conforme a dichas normativas. Se consideró aceptable un coeficiente de determinación ($R^2 \geq 0,99$) para la linealidad, valores de precisión expresados como desviación estándar relativa (%RSD) $\leq 5\%$ para repetibilidad, recuperaciones comprendidas entre 80 % y 110 % para estudios de exactitud en matrices alimentarias, y límites de detección y cuantificación calculados según la relación entre la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración.

Linealidad

La linealidad se evaluó mediante el análisis de soluciones estándar en concentraciones comprendidas entre 1 y 100 mg/L para ambos analitos. Las curvas de calibración obtenidas mostraron una correlación lineal excelente, con coeficientes de determinación $R^2 = 0,999$ para el benzoato de sodio y el sorbato de potasio, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido ($R^2 \geq 0,99$). Las Figs. 4 y 5 confirman gráficamente esta relación lineal, evidenciando una dispersión mínima de los puntos experimentales respecto a la línea de regresión.

Las ecuaciones de regresión lineal obtenidas para las curvas de calibración fueron las siguientes:

- **Benzoato de sodio:** Área (mAU·s) = $18937 \times \text{Concentración (mg/L)} + 23516$
- **Sorbato de potasio:** Área (mAU·s) =

$$69465 \times \text{Concentración (mg/L)} + 91786$$

donde el área corresponde a la señal cromatográfica integrada expresada en miliunidades de absorbancia por segundo (mAU·s), y la concentración se expresa en miligramos por litro (mg/L).

Todo esto evidencia la buena respuesta del detector y la proporcionalidad directa entre señal cromatográfica y concentración del analito, condición esencial para un método cuantitativo robusto (Shrivastava & Gupta, 2011).

Rango Dinámico Lineal (RDL)

El rango dinámico lineal se estableció experimentalmente como el intervalo de concentraciones en el cual el método demostró simultáneamente linealidad, precisión y exactitud aceptables, de acuerdo con los criterios recomendados por las guías internacionales de validación analítica (ICH Q2(R1), 2005; AOAC International, 2016; Eurachem, 2014).

Para su determinación, se evaluó el comportamiento de las curvas de calibración en distintos niveles de concentración, considerando como criterios de aceptación desviaciones relativas menores al 5% y recuperaciones dentro del intervalo del 80–120%, condiciones necesarias para garantizar confiabilidad cuantitativa.

Bajo estos criterios, el rango dinámico lineal determinado fue:

- **Benzoato de sodio:** 8,45 – 100 mg/L
- **Sorbato de potasio:** 6,23 – 100 mg/L

Estos intervalos representan el rango operativo del

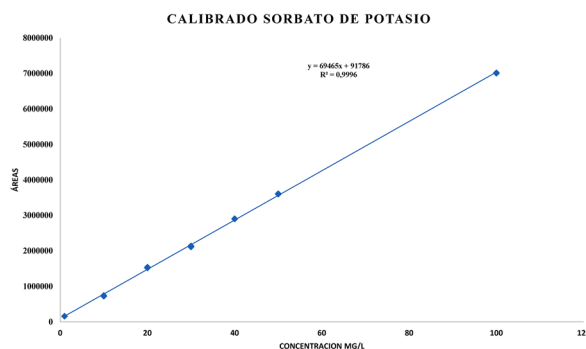


Figura 5. Curva de calibrado del sorbato de potasio.

método para cuantificación confiable en muestras reales, asegurando robustez estadística y desempeño analítico adecuado.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad del método se evaluó mediante la pendiente de las curvas de calibración y la determinación de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), calculados a partir de la desviación estándar residual y la pendiente de la curva de calibración, siguiendo los criterios establecidos por la guía ICH Q2(R1) (2005).

Los valores obtenidos evidenciaron una elevada sensibilidad instrumental:

Benzoato de sodio:

- Pendiente: 18 937
- LOD: 0,15 mg/L
- LOQ: 0,45 mg/L

Sorbato de potasio:

- Pendiente: 69 465
- LOD: 0,18 mg/L
- LOQ: 0,54 mg/L

Estos resultados (Tabla 3) confirman la capacidad del método para detectar y cuantificar ambos analitos a niveles traza, lo que respalda su aplicabilidad en matrices alimentarias complejas.

Exactitud y precisión del método

La exactitud del método se evaluó mediante ensayos de recuperación en muestras fortificadas a niveles representativos dentro del rango de trabajo, obteniéndose valores comprendidos entre 95,2% y 102,4% para ambos analitos. Estos resultados se encuentran dentro del intervalo aceptable recomendado para métodos cuantitativos en matrices alimentarias (80–120%), conforme a los lineamientos establecidos por las guías internacionales de validación analítica (ICH Q2(R1), 2005; AOAC International, 2016; Eurachem, 2014).

La precisión del método se determinó en términos de repetibilidad (precisión intradía) y precisión intermedia (interdía), expresadas como desviación estándar relativa (RSD). Los valores obtenidos fueron inferiores al 2% en todos los casos, evidenciando una adecuada reproducibilidad del procedimiento analítico bajo condiciones experimentales controladas.

El desempeño observado confirma la confiabilidad del método para la cuantificación simultánea de conservantes en matrices alimentarias complejas. Resultados de validación comparables han sido reportados previamente por el equipo investigador en la determinación cromatográfica de compuestos en matrices alimentarias y biológicas, lo que respalda la consistencia metodológica del enfoque analítico

Tabla 3. Parámetros de calibración del método HPLC.

Parámetro	Benzoato de sodio	Sorbato de potasio
Ecuación de la recta	$Y = 18937X + 23516$	$Y = 69465X + 91786$
Coeficiente de correlación (R^2)	0,999	0,999
n (puntos de calibración)	21	21
Pendiente (b)	18937	69465
Intersección (a)	23516	91786
Desviación estándar (S_e)	15997,54	43273,13
Límite de detección (LOD)	0,15 mg/L	0,18 mg/L
Límite de cuantificación (LOQ)	0,45 mg/L	0,54 mg/L
Límite inferior del rango lineal cuantificable (mg/L)	2,53 mg/L	1,87 mg/L
Rango Dinámico Lineal (RDL)	8,45–100 mg/L	6,23–100 mg/L

Tabla 4. Contenido de conservantes en mermeladas comerciales (mg/100 g, media $\pm$ SD, n = 3). < LD: Menor al límite de detección.

Muestra	Benzoato de sodio (mg/100 g)	CV %	Sorbato de potasio (mg/100 g)	CV %
Muestra A	19,05 $\pm$ 1,16	6,10	< LD	—
Muestra B	153,59 $\pm$ 4,19	2,73	12,23 $\pm$ 0,14	1,18
Muestra C	140,90 $\pm$ 12,28	8,72	11,96 $\pm$ 0,94	7,83
Muestra D	81,71 $\pm$ 3,08	3,77	53,70 $\pm$ 0,38	0,70
Muestra E	56,32 $\pm$ 0,26	0,46	95,13 $\pm$ 1,03	1,08

aplicado en el presente estudio (Benítez-Villalba *et al.*, 2021; Benítez-Villalba *et al.*, 2024).

Aplicación del método a muestras comerciales

El método validado fue aplicado a cinco muestras comerciales de mermeladas de guayaba adquiridas en el mercado paraguayo, etiquetadas como Muestra A hasta Muestra E. Cada muestra fue analizada en triplicado (n = 3) bajo condiciones de repetibilidad instrumental, realizándose tres inyecciones independientes a partir de la misma solución de muestra. La cuantificación se efectuó utilizando la curva de calibración correspondiente y los resultados se expresaron en mg/kg, considerando una densidad aproximada de 1 g/mL (Tabla 4 y Fig. 6).

Interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos tras la aplicación del método HPLC validado a cinco muestras comerciales de mermeladas de guayaba evidenciaron variaciones cuantitativas en el contenido de los conservantes analizados entre las distintas marcas.

Expresados en base a masa del producto (mg/100 g), los valores de benzoato de sodio oscilaron entre 19,05 mg/100 g y 153,59 mg/100 g, mientras que el sorbato de potasio presentó concentraciones comprendidas entre valores inferiores al límite de detección y 95,13 mg/100 g. Considerando el límite máximo establecido por el Codex Alimentarius para estos conservantes en mermeladas (1000 mg/kg, equivalente a 100 mg/100 g), se observa que la mayoría de las muestras presentaron concentraciones dentro de los niveles de referencia internacional. La

muestra A registró el menor contenido de benzoato de sodio (19,05 $\pm$ 1,16 mg/100 g) y no presentó sorbato de potasio detectable (< LD), evidenciando una formulación con bajo uso de conservantes.

Las muestras D y E también mostraron concentraciones de benzoato de sodio dentro de los valores normativos, con niveles de 81,71 $\pm$ 3,08 mg/100 g y 56,32 $\pm$ 0,26 mg/100 g, respectivamente. Por el contrario, las muestras B y C presentaron concentraciones de benzoato de sodio superiores al límite de referencia, con valores de 153,59 $\pm$ 4,19 mg/100 g y 140,90 $\pm$ 12,28 mg/100 g, respectivamente. En cuanto al sorbato de potasio, este conservante fue detectado en cuatro de las cinco muestras analizadas, observándose las concentraciones más elevadas en las muestras D (53,70 $\pm$ 0,38 mg/100 g) y E (95,13 $\pm$ 1,03 mg/100 g), todas dentro del rango permitido por la normativa internacional. La presencia simultánea de ambos conservantes en la mayoría de las muestras es consistente con prácticas tecnológicas habituales en la industria alimentaria, donde el uso combinado de agentes antimicrobianos permite ampliar el espectro de acción frente

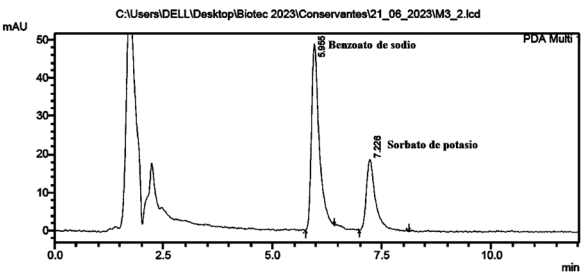


Figura 6. Cromatograma de los conservantes en una muestra comercial.

a microorganismos y mejorar la estabilidad del producto durante su vida útil (Lück & Jager, 1995; Jay *et al.*, 2005).

El análisis por replicado mostró coeficientes de variación bajos en la mayoría de los casos (0,46–8,72 %), lo que evidencia una adecuada precisión y reproducibilidad del método en matrices alimentarias reales. Los valores de CV ligeramente superiores observados en la muestra C pueden atribuirse a variaciones propias de la heterogeneidad de la matriz o del proceso de muestreo, sin afectar la confiabilidad global del desempeño analítico (Benítez-Villalba *et al.*, 2022; Benítez-Villalba *et al.*, 2019). Estos resultados confirman la capacidad del método cromatográfico validado para la determinación simultánea, precisa y reproducible de conservantes en mermeladas comerciales, demostrando su aplicabilidad como herramienta analítica robusta para estudios de composición alimentaria, evaluación técnica de productos procesados y soporte a sistemas de aseguramiento de calidad.

Conclusión

Este trabajo de investigación permitió desarrollar, validar y aplicar un método analítico basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación simultánea de benzoato de sodio y sorbato de potasio en mermeladas comerciales de guayaba. La metodología demostró un desempeño analítico adecuado, caracterizado por alta linealidad, sensibilidad, precisión y reproducibilidad, cumpliendo los criterios establecidos por guías internacionales de validación analítica, lo que confirma su idoneidad como herramienta confiable para la determinación simultánea de conservantes en matrices alimentarias complejas.

La aplicación del método a muestras comerciales evidenció variaciones en el contenido de conservantes entre diferentes formulaciones, situándose la mayoría de los valores dentro de los niveles de referencia internacionales. Estos resultados ilustran la utilidad del procedimiento desarrollado para estudios de composición alimentaria y evaluación técnica de productos procesados, así como para el soporte analítico de sistemas de aseguramiento de

calidad en la industria alimentaria.

Desde una perspectiva metodológica, el estudio aporta un procedimiento validado, sensible y reproducible que fortalece el enfoque analítico aplicado al control de conservantes en alimentos. La validación se realizó bajo condiciones intralaboratorio y en matrices reales, lo que permitió demostrar de manera robusta el desempeño del método en escenarios analíticos representativos.

En términos de proyección, futuras investigaciones podrían ampliar su alcance mediante estudios colaborativos interlaboratorio, la evaluación en un mayor número y diversidad de matrices alimentarias, y la profundización del análisis del efecto matriz mediante ensayos de recuperación en muestras fortificadas. Estas líneas de trabajo contribuirán a consolidar la aplicabilidad del método en programas de monitoreo rutinario, control de calidad y vigilancia analítica en el sector alimentario.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su sincero agradecimiento al Programa de Iniciación Científica (PIC) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción, así como al Departamento de Química, por el apoyo institucional brindado para la realización de esta investigación. El acceso a los laboratorios, materiales y equipos proporcionado por estas unidades fue fundamental para el desarrollo experimental y la obtención de resultados significativos.

Asimismo, se agradece a todos los colaboradores y participantes que, con su tiempo, compromiso y esfuerzo, hicieron posible la ejecución exitosa de este proyecto. Este trabajo no habría sido posible

sin la contribución de cada uno de ellos.

Literatura citada

- AOAC International (Ed.). (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th Ed.). Gaithersburg: AOAC International. 3100 pp.
- Benítez-Villalba, J.C., Zafra-Gómez, A., Juárez-Jiménez, M.J.B., Dorival-García, N., Ferreira-Benítez, F.P., Rodríguez-Bonet, S. & Vélchez, J.L. (2017). Biodegradation of the benzophenone-3 in agricultural soils amended with compost from urban wastewater treatment plants. *Reportes Científicos de la FACEN*, 8(1): 79–88. <<http://dx.doi.org/10.18004/rcfacen2017080179-88>>.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N.M. & Vélchez, J.L. (2018). Validación de un método de análisis de benzofenonas en muestras de suelo por extracción con líquidos presurizados y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Reportes Científicos de la FACEN*, 9(1): 51–63. <<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2018.9.1.51>>.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N.M., Ferreira-Benítez, F.P., Rodríguez-Bonet, S. & Vélchez, J.L. (2019). Estudio cinético y degradación del triclosán y triclocarbán en suelos agrícolas enmendados con compost. *Reportes Científicos de la FACEN*, 10(1): 37–48. <<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2019.10.1.37>>.
- Benítez-Villalba, J.C., Grau-Torales, M.L., Cristaldo-López, O.D., Bogado-Fernández, A.I., Arrúa-Martínez, L.A. & Villalba-Villalba, N.M. (2021). Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial: UV-visible y HPLC. *Reportes Científicos de la FACEN*, 11(1): 48–58. <<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2021.12.1.48>>.
- Benítez-Villalba, J.C., Grau-Torales, M.L., Cristaldo-López, O.D., Bogado-Fernández, A.I., Arrúa-Martínez, L.A. & Villalba-Villalba, N.M. (2022). Determinación y cuantificación de glucósidos de esteviol en las hojas de stevia comercial (*Stevia rebaudiana* Bertoni) mediante cromatografía de líquido de alta resolución HPLC. *Reportes Científicos de la FACEN*, 13(2): 194–205. <<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2022.13.2.194>>.
- Benítez-Villalba, J.C., Barrios, M. & Benítez-Peña, M. (2023). Validación de una metodología analítica para la cuantificación de la ciprofloxacina en huevos de gallinas mediante HPLC. *Reportes Científicos de la FACEN*, 14(1): 50–61. <<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2023.14.1.50>>.
- Benítez-Villalba, J.C., Silva-Peña, R.A., Cristaldo-López, O.D., Bogado-Fernández, A.I. & Arrúa-Martínez, L.A. (2024). Detección y cuantificación de la norfloxacina en carne de pollos comercializadas en supermercados del Gran Asunción. *Reportes Científicos de la FACEN*, 15(1): 3–14. <<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2024.15.1.003>>.
- Casp, A. & Requena, T. (2003). *Biotechnología de los alimentos: Fundamentos y aplicaciones* (1.ª Ed.). Zaragoza: Ediciones Acirbia. 512 pp.
- Codex Alimentarius (Ed.). (2017). *General Standard for Food Additives (CODEX STAN 192-1995) (Revised 2017)*. Roma: FAO/WHO. [Consulted: 20.v.2025]. <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>>.
- Codex Alimentarius (Ed.). (2023). *General Standard for Food Additives (GSFA)*. Roma: FAO/WHO. [Consulted: 20.v.2025]. <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>>.
- EURACHEM (Ed.). (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd Ed.). Stirling: Eurachem. [Consulted: 20.v.2025]. <<https://www.eurachem.org>>.

- FAO & WHO (Eds.). (2020). *Evaluation of Certain Food Additives: Eighty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Technical Report Series No. 1020)*. Ginebra: World Health Organization. 200 pp.
- FAO/WHO (Eds.). (2021a). *Food Additives Permitted in Food by FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Roma: FAO/WHO. [Consulted: 20.v.2025]. <<https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>>.
- FAO/WHO (Eds.). (2021b). *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants (WHO Food Additives Series No. 80)*. Ginebra: World Health Organization. 300 pp.
- Fennema, O.R. (2000). *Química de los alimentos* (3.^a Ed.). Zaragoza, España: Ediciones Acribia. 1150 pp.
- ICH (Ed.). (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Ginebra: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. [Consulted: 20.v.2025]. <<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>>.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th Ed.). New York, NY: Springer. 790 pp. <>.
- Kirk, R.S., Sawyer, R. & Egan, H. (2004). *Composición y análisis de los alimentos de Pearson* (9.^a Ed.). Madrid: Addison Wesley. 1050 pp.
- Lück, E. & Jager, M. (1995). *Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects*. New York: Springer-Verlag. 250 pp. <<https://doi.org/10.1007/978-3-642-59202-7>>.
- Moldoveanu, S.C. & David, V. (2015). *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Amsterdam: Elsevier. 700 pp.
- Shrivastava, A. & Gupta, V.B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1): 21–25. <<https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>>.