

870127

11

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



FALLA DE ORIGEN

METODOS DE SEPARACION E IDENTIFICACION DE
COLORANTES EN ALIMENTOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MELBA GRISELDA ORTEGA ARREOLA

A S E S O R :

Q.F.B. BEATRIZ GARCIA VAZQUEZ

GUADALAJARA, JALISCO.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pag.
I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	
1.- Historia	2
2.- Aspectos generales	3
3.- Artículos	10
4.- Adulteración	12
5.- Cromatografía.	12
III.- DETERMINACION DE COLORANTES SINTETICOS EN ALIMENTOS	
1.- Tratamiento preliminar del alimento . . .	14
2.- Extracción y purificación de los colorantes	15
3.- Separación de los colorantes	17
4.- Identificación de los colorantes separados	17
IV.- METODOLOGIA	
1.- Selección del método	18
2.- Muestreo	19
3.- Métodos y material	20
a) Método de la lana	20
b) Método del sep-pak	24
c) Método de la columna de Celita	27
4.- Separación de los colorantes	30
5.- Identificación de los colorantes separados	32
V.- RESULTADOS	34
VI.- CONCLUSIONES	41
VII.- BIBLIOGRAFIA	43

CAPITULO I
I N T R O D U C C I O N

Cuando los alimentos presentan una coloración adecuada se dice que el sabor es correcto, ya que el color es la primera impresión sensorial que se tiene de un alimento, incluso puede influir en la percepción de su olor, sabor e incluso su textura.

Los colorantes utilizados como aditivos deben ser utilizados con el propósito de perfeccionar los productos alimenticios, mejorar el valor organoléptico y obtener así aceptabilidad estética atractiva para el consumidor.

Estas sustancias químicas son valoradas y estandarizadas por considerarse ventajosas.

Los métodos de separación e identificación de los colorantes en alimentos se han diseñado en base a la necesidad que existe actualmente en los laboratorios estatales de salud pública, ya que no cuentan con ninguna metodología establecida; por lo que se desea que este trabajo de tesis funcione con carácter si no oficial, sí que reúna los requisitos más importantes para su validación posterior, basándose en técnicas que la FDA* sigue para su investigación de colorantes sintéticos y en el uso de estándares certificados por ella misma.

Los alimentos que fueron objeto de estudio en el siguiente trabajo se seleccionaron teniendo en cuenta el gran consumo que tienen dentro de la región, ya que éstos son elaborados casi en su totalidad en el estado de Colima.

* Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos de los E.U. de A.).

CAPITULO II
GENERALIDADES

1. HISTORIA.

El uso de sustancias colorantes en los alimentos - juega un papel importante en la aceptabilidad de los productos por el consumidor, reconociéndose la necesidad de regular los compuestos usados para colorear los alimentos desde principio de siglo, cuando se usaban sales coloradas de metales pesados para restaurar el color de los alimentos procesados. El primer estudio comprensivo sobre la coloración de los alimentos es referido por Fuhner en 1923, en el cual se mencionó que generalmente las sales básicas de diazonio tenían un potencial toxicológico, mientras que las sales ácidas de diazonio eran totalmente inocuas. Como resultado de estudios posteriores se ha venido reduciendo dramáticamente la coloración con productos artificiales, por ejemplo, la lista de colorantes en Suiza, a partir de 1957 redujo de 28 a 12 el número de colorantes en ese país. En el Reino Unido el comité de estándares de alimentos en una lista de 30 la redujo a 24 colorantes alimenticios sintéticos, la mayoría derivados del alquitrán de hulla y como tercer y último ejemplo puede mencionarse que en 1952 la lista de colorantes comprendía 18 compuestos, mientras que la última revisión del Food Chemical News de 1967 autorizó el uso de sólo 8 de estos compuestos.

2. ASPECTOS GENERALES.

Las sustancias que imparten color a los recipientes que contienen alimentos no se consideran como aditivos de color. Los ingredientes alimenticios tales como cerezas, pimienta, chocolate y jugo de naranja que imparten su color a los alimentos, no son considerados como aditivos de color, pero cuando alguno, por ejemplo, jugo de betabel se usa para impartir color en forma deliberada, si se cata loga como aditivo de color.

Algunos Colorantes utilizados como Alimentos:

VERDE No. 3

Verde Firme FCF

C.I. 42053

Está constituido por la sal disódica del 4- $\left\{ \left[4 - \left(14 - \left(N - \text{etil} - p - \text{sulfobencilamina} \right) - \text{fenil} \right) - 14 - \text{hidroxi} - 2 - \text{sulfoniofenil} \right] - \text{metileno} \right\} - \left[1 - \left(N - \text{etil} - N - p - \text{sulfobencil} \right) - \Delta^{2,5} - \text{ciclohexadienimina} \right]$

Se obtiene en forma cualitativa neutra.

Es estable en soluciones neutras o ácidas.

Este colorante puede decolorarse en soluciones de hidróxido de sodio 0.1 N.

VIOLETA No. 1

Violeta lana 5 BN

s/c

Está constituido por la sal monosódica del 4 - $\left\{ 4 - \right.$

(N - etil - p - sulfobencilamino) - fenil] - [4 - (N - etil - p - sulfoniobencilamino) - fenil] - metileno } - (N, - N - dimetil - $\Delta^{2,5}$ - ciclohexadienimina).

ROJO No. 2

Amaranto
C.I. 16185

Sal trisódica del ácido 3, 6 - disulfónico - 1 -
{ 4 - sulfo - 1 - naftilazo } - 2 - naftol.

Es conocido también como Rojo Cltrico.

Se utiliza para colorear la cáscara de las naranjas, siempre y cuando no se sometan posteriormente a algún proceso industrial o casero con el fin alimenticio (como extracción de aceite esencial, la preparación de conservas, mermeladas, etc.) y además no se utilice una cantidad superior a 2 ppm respecto al peso total de cada fruta.

Sólo podrán utilizarse siempre que las naranjas sobre las que se aplica, tengan el grado adecuado de madurez.

Todos los lotes de Rojo Cltrico No. 2 deberán tener autorización de la Secretaría de Salubridad y Asistencia para ser comercializados.

El Rojo Cltrico No. 2 se encuentra prohibido en EE.UU. desde hace diez años.

El colorante es estable en soluciones ácidas, básicas o neutras.

Este colorante tiene como sinónimo rojo cltrico No.2.

ROJO No. 3

Eritrosina

C.I. 45430

Sal disódica del 9 - o - carboxi - fenil - 6 - hidroxi - 2 , 4 , 5 , tetrayodo - 3 - isoxantosa.

Se usa rutinariamente pero tanto física como químicamente tiene ciertas propiedades limitadas para su aplicación en algunos alimentos, tal es el caso de la coloración para galletas.

Es estable en solución diluida de hidróxido de amonio cuando se encuentra almacenado en un sitio oscuro. La luz solar puede causar una rápida decoloración.

Puede decolorarse lentamente cuando está en solución de hidróxido de sodio 0.1 N y es almacenada en un sitio oscuro.

El colorante es aislado en solución diluida de hidróxido de amonio - acetato de amonio.

Es insoluble a pH bajos.

Es importante tener en cuenta que el Rojo No. 3 no da coloración en medio ácido.

ROJO No. 4

Ponceau sx
C. I. 14700

Sal disódica del ácido 4 - sulfónico , 2 - (5 - sulfo - 2 , 4 - xililazo) - 1 - naftol.

Su uso es limitado, se emplea únicamente para la coloración de cerezas con una cantidad que no exceda de 150 ppm.

Este colorante anteriormente fue permitido en alimentos, actualmente sólo se permite en uso externo.

El colorante es estable en solución ácida, básica o neutra.

ROJO No. 40

Rojo Allura
C. I. 16035

Está constituido por la sal disódica del ácido 6 - hidroxí - 5 - [(2 - metoxi - 5 - metil - 4 - sulfo - fenil) azo] - 2 - naftalensulfónico.

Se utiliza en forma rutinaria.

Tiene matiz naranja.

El Rojo No. 40 es estable cuando se encuentra en solución ácida, básica o neutra.

ANARANJADO B

C.I. 19235

Está constituido principalmente por la sal sódica - del 1 - (4 - sulfofenil) - 3 - etilcarboxi - 4 - 4 - (4 - sulfonaftilazo) - 5 - hidroxipirazol.

Se utiliza para colorear la cubierta o piel de salami, salchichas, chorizo y embutidos similares y se puede emplear siempre y cuando la cantidad del colorante no sea superior a 150 ppm. respecto al peso unitario del producto final.

Todos los lotes de anaranjado B deberán tener autorización de la Secretaría de Salubridad y Asistencia para poder ser autorizados.

AMARILLO No. 5

Tartrazina

C.I. 19140

Está constituido por la sal trisódica del 3 , carboxi - 5 - hidroxil - 1 - p - sulfofenil - 4 - p - sulfofenil - azo - pirazol.

Se obtiene en forma cualitativa neutra.

Es estable en solución ácida, básica o neutra.

En cantidades considerables puede producir alergia a determinadas personas.

AMARILLO No. 6

Amarillo crepúsculo FCF

C. I. 15985

Está constituido por la sal disódica del ácido
6 - sulfónico - 1 - p - sulfofenil - azo - 2 - naftol.

Se obtiene en forma cualitativa neutra.

Es estable cuando se encuentra en soluciones aci-
das, básicas o neutras.

AZUL No. 1

Azul brillante FCF

C. I. 42090

Está constituido por la sal sódica de 4 - [[
4 - (N - etil - p - sulfobencilamino) - fenil - (2 -
sulfoniofenil) - metileno] - [1 - (N - etil - N - p -
sulfobencil (- $\Delta^{2,5}$ - ciclohexadienimina)] .

Se obtiene en forma cualitativa neutra.

Es estable cuando se encuentra en solución ácida o
cuando se encuentra en solución neutra.

Este colorante puede decolorarse lentamente en solu-
ción de hidróxido de sodio 0.1 N.

AZUL No. 2

Indigotina

C. I. 73015

Está constituido por la sal disódica del ácido disulfónico 5, 5' - indigotin.

Se obtiene en forma cualitativa neutra.

Es relativamente estable en soluciones ácidas o en soluciones neutras.

Este colorante puede decolorarse en solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

3. ARTICULOS.

El uso de aditivos de color está directamente relacionado con el perfeccionamiento de los productos, mejorando el valor organoléptico y la aceptabilidad estética de los alimentos.

Este objetivo no puede ser justificado si el producto terminado es inseguro o peligroso por lo que la Ley General de Salud estipula:

Art. 6°.- Sólo se permite el empleo de los aditivos en alimentos y bebidas, cuando se considera estrictamente necesario para la buena elaboración, presentación y/o conservación de los mismos, y nunca para enmascarar defectos de calidad.

Art. 10°.- Para los efectos de este reglamento, se entiende por colorantes aquellas sustancias que se agregan a los comestibles y bebidas con el fin de proporcionar o intensificar su color, y se dividen en:

I. Colorantes orgánico-naturales.

Aquellos de origen vegetal o animal, y

II. Colorantes orgánico-sintéticos.

Aquellos cuyo material colorante sea uno o más productos derivados del alquitran de hulla o uno o más compuestos relacionados con su estructura química a tales derivados.

Art. 12°.- Únicamente se permite el empleo de los siguientes colorantes orgánico-sintéticos, que para los efectos de este reglamento se denominarán colorantes artificiales .

Amarillo	No. 5	(Tartrazina)
Amarillo	No. 6	(Sun set FCF)
Azul	No. 2	(Indigotina)
Rojo	No. 1	(Ponceau 3 R)
Rojo	No. 2	(Amaranto)
Rojo	No. 3	(Eritrosina)
Rojo	No. 4	(Ponceau sx)
Rojo	No. 5	(Carmoisina)
Rojo	No. 6	(Ponceau 4 R)
Rojo	No. 40	(Rojo Allura AC)
Violeta	No. 1	(Violeta lana 5 BN)
Verde	No. 3	(Verde firme FCF)

4. ADULTERACION.

Es calificado como adulterado un alimento si el defecto o inferioridad de la calidad se encubre de cualquier manera, si una sustancia se ha mezclado o adicionado al alimento para aumentar el peso o el volumen de éste, o para hacer que éste aparente mayor calidad de la que posee. Estas definiciones deben tomarse en cuenta para permitir el uso o no permitirlo de los colorantes en alimentos. Se permite únicamente el uso de colorantes en cantidades mínimas y determinadas en los siguientes productos: carne cruda, venado, aves, pescado, frutas o legumbres; té, esencia de té, café, productos de café, leche deshidratada y condensada; leche, crema y ciertos tipos de pan, queso y mantequilla. El colorante básico violeta de metilo sólo puede ser usado para marcar la carne cruda y las frutas cítricas. En USA la adición de materias colorantes a los alimentos está controlada por la "The Coloring Matter in Food Regulations 1966" siendo actualizada en 1973, la cual da una lista de los compuestos que se pueden utilizar. Los más comunes son los colorantes derivados del alquitrán de carbón, solubles en agua.

5. CROMATOGRAFIA.

Los primeros investigadores sobre colorantes en alimentos utilizaron técnicas cromatográficas en papel, APA (1960) y Pearson (1973). (La cromatografía es un proceso físico dinámico en el cual las sustancias que componen una mezcla son separadas debido a sus diferentes afinidades por dos sustancias a las que se les denomina fases; una es fija o estacionaria y la otra es móvil).

La cromatografía en papel es una variante de la --
combinación de cromatografía de partición y de adsorción.

Existe otro procedimiento llamado cromatografía en
capa fina usándose gel de sílice, celulosa y poliamida co-
mo fases estacionarias y se han descrito muchas y variadas
mezclas de disolventes. Pearson (1975) da una lista de
10 disolventes, pero el propanol / amoníaco (4 : 1) fue
considerado como satisfactorio para un sistema general al
usar gel de sílice.

Graichen (1975) ha descrito el resultado de un -
estudio en colaboración, sobre el uso de intercambiadores_
iónicos líquidos para eluir los colorantes de columnas --
preparadas por mezcla de alimentos con celite y una fase -
acuosa.

Más recientemente se ha aplicado la cromatografía -
líquida de alta presión. Chudy y Cols. (1978) usaron --
Hypersil SAS y Spherisorb S 5 W con mezclas de: isopropa--
nol / agua / cetrimida / ácido acético como fase móvil. -
Noday Nishike (1977) usaron octadecilisilano y un sis-
tema gradiente de carbonato de amonio / metanol para la -
separación de 10 colorantes.

CAPITULO III

DETERMINACION DE COLORANTES SINTETICOS

1. TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL ALIMENTO.

Como base se tiene que:

El tamaño máximo de la muestra debe ser de 50 g. y la máxima cantidad de colorante debe ser de 5 mg.

Para realizar el tratamiento preliminar se debe tener en cuenta tanto el estado físico como químico de la muestra; esto ayuda a trabajar más fácilmente y da resultados más confiables durante su procesamiento.

Se determina que:

- 1.- Si el producto se encuentra en partículas, la muestra total debe ser disuelta para usar una alícuota apropiada.
- 2.- Si la muestra es homogénea, el peso directo de la muestra es satisfactorio.
- 3.- Si la muestra se encuentra coloreada en forma no homogénea, separar la parte coloreada obteniendo así una alícuota con el peso adecuado para su análisis.
- 4.- Si la muestra presenta una variedad de diferentes colorantes unidos, deberán ser separados en submuestras y cada una de ellas deberá ser analizada por separado.

2. EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS COLORANTES.

Para realizar la extracción de los colorantes sintéticos primeramente la muestra se prepara eliminando partículas que puedan interferir durante su procesamiento; estas sustancias extrañas pueden ser grasa, almidón, productos con carácter ácido, etc. y después elegir los métodos o el método más adecuado dependiendo del estado físico de la muestra. En algunos casos se eligió la combinación de estos métodos para obtener una muestra que presente ventajas al realizar la identificación de los colorantes que presente.

Los métodos cualitativos que se utilizaron son:

1. Método de la lana.

Fundamento = Los colorantes artificiales solubles en agua tienen carácter ácido y colorean la lana en disolución ácida, obteniéndose así el color primeramente, y posteriormente se deja en libertad en medio alcalino; después puede identificarse en cromatografía de papel comparándolos con colorantes patrón.

2. Método del C_{18} sep - pak.

Fundamento = Consiste en introducir la muestra a una jeringa y hacerla pasar a través de un cartucho llamado sep - pak. Este es de material de sílice que funciona como una pequeña columna, la cual se utiliza únicamente con muestras líquidas para separar los colorantes que son solubles sólo en agua.

3. Método de la columna de celita.

Fundamento - A través de una columna de vidrio hecha a base de sílice se obtiene el colorante que es extraído por gravedad. Este método de extracción resulta selectivo para el colorante Rojo No. 19 conocido también con el nombre de Rodamina.

3. SEPARACION DE LOS COLORANTES .

Para separar e identificar un colorante o diferentes colorantes en una mezcla en esta metodología se utiliza una técnica conocida como cromatografía en papel que se usa generalmente en análisis cualitativos, es decir, cuando se trata de determinar la clase de colorantes como en este caso y no la cantidad de ellos.

Fundamento = La base de la cromatografía en papel es la migración diferencial de las moléculas; esto es, que su flujo desde el punto de partida se hace con velocidades distintas para cada colorante.

4. IDENTIFICACION DE LOS COLORANTES SEPARADOS.

Cada mancha que se observa en el papel representa un colorante diferente o la combinación de varios colorantes.

Se pueden identificar cada uno de ellos comparando su velocidad de avance, llamado "R_f" (relación de frentes), con los colorantes y estándares.

CAPITULO IV
METODOLOGIA

1. SELECCION DEL METODO

La selección de un método se realiza con base a la naturaleza de la muestra y al tamaño de partículas, por lo cual, es necesario ante todo tener en cuenta:

- a) Si se encuentra en estado líquido y se encuentra limpia se puede aplicar directamente el método del C_{18} sep - pak.
- b) Si se encuentra en estado sólido y esta puede pasar al estado líquido, encontrándose la muestra limpia puede utilizarse el método del C_{18} sep - pak; pero si la muestra se encuentra turbia es conveniente utilizar el método de la lana.
- c) Si se encuentra en estado sólido, es necesario dar un tratamiento previo a fin de eliminar casi en su totalidad la substancia empleada en conferirle volumen y dejar si es posible exclusivamente la parte coloreada; en este caso se empleará el método de la lana y si resulta necesario se empleará el método de la columna de celita, utilizado en muestras que se sospeche tengan el colorante de Rodamina, ya que es uno de los colorantes sintéticos que no se impregna en la lana.

2. MUESTREO .

Los alimentos que fueron objeto de estudio en el siguiente trabajo de tesis se seleccionaron teniendo en cuenta el gran consumo que tienen dentro de la región por medio de la población infantil y a que algunos de éstos son elaborados en el estado obteniendo productos que se encuentran registrados con colorantes o se sospechó que los contengan debido a su apariencia, se buscaron marcas diferentes de determinados productos y de cada uno de ellos se escogieron los sabores existentes.

Se agruparon de la siguiente manera atendiendo a su consistencia para la aplicación de los diferentes métodos de identificación y separación de colorantes.

Grupo No. 1

(muestras líquidas)

- jugos
- bolis
- gelatinas
- paletas de agua

Grupo No. 2

(muestras sólidas)

- dulces duros
- dulces blandos (borrachitos)
- alfajor de coco
- gomitas
- gránulos
- chilitos en polvo
- gomas de mascar
- salchichas

3. METODOS Y MATERIAL.

1.- Método de la lana.

En la determinación de colorantes por el método de la lana la muestra debe ser preparada dependiendo de la naturaleza del alimento a analizar, por ejemplo, si contienen grasa, almidón, etc., deben eliminarse previamente a su procedimiento.

MATERIAL

- * vasos de precipitado de 250 ml
- * mortero
- * agitadores
- * papel filtro
- * placa caliente

REACTIVOS

- * ácido acético glacial (diluido)
- * alcohol al 70%
- * alcohol al 50% o
- * acetona
- * hidróxido de sodio al 2%
- * Éter de petróleo

A.- Extracción a partir de alimentos ácidos.

En el caso de alimentos líquidos de carácter ácido, por ejemplo bebidas refrescantes no alcohólicas, se añaden unas gotas de ácido acético glacial diluido, se hierve la mezcla y se continúa con el procedimiento de la lana.

En el caso de dulces, mermelada, etc., se disuelven

en un pequeño volumen de agua antes de la adición del ácido acético glacial.

B.- Extracción a partir de alimentos feculentos.

Los polvos para flanes, harina de confitería, etc., se trituran en un mortero con alcohol al 70% conteniendo un 2% de amoníaco, se deja la mezcla reposar y después se filtra. Se evapora el extracto a baño maría o en placa caliente, se agita el residuo con agua y con ácido acético glacial diluido para después continuar con el procedimiento de la lana.

C.- Extracción a partir de alimentos grasos.

Los productos cárnicos (u otros alimentos grasos) se trituran bien con alcohol al 50% o con acetona y un pequeño volumen de amoníaco diluido. La mezcla, después de un reposo de 30 minutos como mínimo se filtra. Se evapora el filtrado a baño maría o placa caliente, se extrae el residuo con agua, se añade ácido acético glacial y se continúa con el procedimiento de la lana.

* Si la muestra contiene mucha grasa convendrá separarla previamente agitando el producto con éter de petróleo.

PROCEDIMIENTO GENERAL.

MATERIAL

- * vasos de precipitado de 100 ml
- * pipetas graduadas de 10 ml
- * agitadores
- * baño de vapor o
- * placa caliente
- * lana pura de color blanco
- * tijeras

REACTIVOS

- * alcohol etílico G.R.
- * ácido acético glacial o
- * hidróxido de amonio (diluido)
- * ácido clorhídrico 0.1 N

En un vaso de precipitado de 100 ml colocar aproximadamente 10 g de muestra preparada, agregar 60 ml de agua, 14 ml de ácido acético glacial y una tira de lana de aproximadamente 15 a 20 cm. de largo. Llevar a ebullición sobre un baño de vapor durante 90 minutos o en placa caliente hasta casi un total de su evaporación. Remover la lana con el colorante y retirarla del vaso para lavarla con - - agua, después con alcohol etílico (para que quede libre de grasa), enjuagar la tira de lana nuevamente con agua. Colocar la lana en otro vaso de precipitado de 100 ml, agregar 20 ml de agua y 10 ml de hidróxido de amonio diluido. - Llevar la solución a ebullición en baño de vapor o placa - caliente para permitir la liberación del colorante extraído. Remover y desechar la tira de lana y por medio de evaporación concentrar el colorante extraído.

Notas complementarias para el examen de los colorantes en alimentos por el método de la lana.

- a) Se puede hacer un ensayo previo para comprobar la presencia de varios colorantes mezclados. Para ello se deposita una mancha grande sobre un papel filtro, secándola a la vez que se hace la deposición con objeto de que no se extienda excesivamente, y se le añade una gota de agua. En caso de que contenga distintos colores, por ejemplo azul y amarillo, se observarán las distintas bandas correspondientes a cada colorante.
- b) Todos los colores sintéticos solubles en agua autorizados tienen carácter ácido y tiñen la lana en disolución ácida, con excepción del Rojo No. 19 o Rodamina; cuando el colorante es de origen natural la lana permanece incolora. Los colorantes básicos se pueden aislar de las sustancias alimenticias hirviéndolas con la lana en disolución diluida de amoníaco.
- c) El reactivo ácido acético glacial puede sustituirse por el ácido clorhídrico con normalidad de 0.1 en el procedimiento general.
- d) Si existe una concentración grande de colorante en nuestra muestra ya procesada se puede disolver en alcohol al 75% y después proseguir con su separación. Pero si la concentración de colorante es baja y se encuentra turbia es preferible hacerle una limpieza que consiste en acidificar el colorante extraído con ácido clorhídrico 1 N a 3 N.

2.- Método del sep - pak.

MATERIAL.

- * jeringa de 10 ml
- * cartucho C₁₈ sep - pak
- * vasos de precipitado de 100 ml
- * pipetas
- * pizeta
- * placa caliente

REACTIVOS.

- * alcohol etílico G.R.
- * alcohol etílico al 20%
- * alcohol etílico al 10%
- * alcohol etílico al 50%
- * ácido acético glacial
- * ácido clorhídrico 1 N
- * hidróxido de amonio al 10%
- * metanol

PROCEDIMIENTO.

Preparación del cartucho:

- 1.- Insertar el cartucho C₁₈ sep - pak en una jeringa.
- 2.- Llenar la jeringa con 10 ml de etanol G.R. y hacerlo pasar a través del cartucho para activarlo.
- 3.- Llenar la jeringa con 10 ml de agua y bombear hasta . - que el cartucho se encuentre casi seco.

Tratamiento de la muestra.

- 1.- Acidificar 100 ml de muestra a analizar con 5 ml de ácido clorhídrico 1 N.
- 2.- Llenar la jeringa con la muestra acidificada y bombearla hasta que el cartucho C₁₈ sep - pak quede saturado de colorante.
- 3.- Cuando se sospeche que una mezcla la forma sólo dos colorantes para sacarlos del cartucho podemos hacerlo siguiente:

Si la mezcla es de color morado.

Eluir con etanol al 20% y obtenemos un color rojo, mismo que recogeremos en un vaso de precipitado de 100 ml. Lavar el cartucho con agua. Eluir con etanol G.R. y en otro vaso de precipitado recogeremos el colorante que esta vez tendrá una coloración azul.

Los mismos colores los podemos obtener pero ahora trabajando con diferentes reactivos:

Eluir con hidróxido de amonio al 10% y de esta forma obtenemos el color rojo. Lavar el cartucho con agua. Eluir con etanol al 96% y obtendremos el colorante de tonalidad. azul.

Si la mezcla es de color naranja.

Al eluir con amoníaco al 10% nos da un color amarillo. Lavar con agua el cartucho. Al eluir con etanol al

50% nos da una coloración roja.

Si la mezcla es de color rojo.

Eluir con etanol al 10% y obtendremos un color amarillo. Lavar con agua el cartucho. Eluir con etanol al 50% obteniendo así el color rojo puro.

Si la mezcla es de color verde.

Eluir con amoniaco al 10%; al recogerlo en un vaso de precipitado obtendremos un color amarillo. Lavar con agua el cartucho. Eluir con etanol al 50%, en este caso se observa la extracción del color azul. Los mismos colores los podemos obtener pero ahora trabajando con diferentes reactivos:

Eluir con etanol al 10% y observaremos que aparece el color amarillo. Lavar con agua el cartucho. Eluir con etanol al 50% y en este caso se observa la aparición del color azul.

4.- Si la mezcla presenta gran cantidad de colorantes para sacarlos del cartucho C₁₈ sep - pak se procede como sigue:

- a.- Agregar de 3 a 5 gotas de ácido acético a la muestra y bombearla, se observa que el amarillo No. 5 sale del cartucho.
- b.- Lavar el cartucho con agua y después eluir con etanol al 20%, el colorante que se extrae se trata del amarillo No. 6.
- c.- Lavar el cartucho con ácido acético diluido y eluir

con etanol al 20% y se observa el color rojo No. 40.

- d.- Eluir con etanol al 20% - hidróxido de amonio diluido, el colorante que aparece es el rojo No. 3.
- 5.- Lavar el cartucho C₁₈ sep - pak con etanol al 10% - y si éste no se limpia podemos lavarlo con metanol o si resulta necesario con amoníaco diluido, después - enjuagar con agua.
- 6.- Concentrar el colorante extraído mediante una placa caliente.

3. METODO DE LA COLUMNA DE CELITA

MATERIAL.

- * balanza analítica
- * espátula
- * embudo de rama corta
- * agitador
- * vasos de precipitado
- * probeta de 50 ml
- * mortero con pistilo
- * fibra de vidrio
- * columna de vidrio

REACTIVOS.

- * ácido acético al 20%

- * cloroformo
- * celita (hyflo Super - Cel)

En este método es importante tener en cuenta que:

- 1.- Por cada gramo de muestra pesar dos gramos de celita.
- 2.- Si el alimento contiene humedad considerable dejar un adicional de dos gramos de celita por cada gramo estimado de humedad.
- 3.- Con alimentos de elevada humedad, el volumen de agua - puede minimizarse añadiendo menor cantidad de ácido - acético glacial, así podrá disminuir también la cantidad total de celita requerido.

PROCEDIMIENTO.

Preparación de la muestra .

En un mortero añadir aproximadamente 15 gramos de muestra y 10 ml de ácido acético al 20%, triturar hasta -- que la mezcla quede homogénea (si se tratan muestras como -- por ejemplo dulces, dejarlos reposar en el ácido acético -- unas horas o si se desea se puede calentar la muestra; es -- to es para que resulte más fácil su molienda), incorporar -- 30 gramos de celita en pequeñas cantidades y seguir con la molienda hasta obtener un estado físico apropiado; Este -- se obtiene cuando la mezcla final ya no presenta mucha -- humedad, es decir, hasta conseguir una consistencia -- de arena.

PREPARACION DE LA COLUMNA.

A la columna de vidrio introducirle un pedazo de fibra de vidrio colocándolo hasta la parte inferior del tubo. Con ayuda de un embudo de rama corta colocar la muestra que se encuentra previamente preparada, presionar un poco, colocar más muestra, volver a presionar, seguir así hasta agotar la muestra, procurando quede bien uniforme en el tubo. Agregar otro pedazo de fibra de vidrio con el fin de que se disperse homogéneamente el cloroformo; éste se añade en una cantidad de 50 ml (que es el que eluye la muestra además de separar la grasa que ésta contiene); a continuación se recolecta en un vaso de precipitado el colorante para seguir con su identificación.

4. SEPARACION DE LOS COLORANTES.

Para separar e identificar a un colorante o diferentes colorantes en una mezcla en esta metodología se utiliza una técnica conocida como cromatografía en papel que se utiliza generalmente en análisis cualitativo, es decir, - cuando se trata de determinar la clase de los colorantes, como lo es este caso y no la cantidad de ellos.

Fundamento = La base de la cromatografía en papel es la migración diferencial de las - moléculas; esto es, que su fluir desde el punto de partida es con velocidades distintas para cada colorante.

MATERIAL.

- * tubos capilares
- * papel cromatográfico Whatman
- * cámara cromatográfica rectangular para placa de 20 x 20 cm.

REACTIVOS.

* SISTEMA *

isopropanol - agua - cloruro de sodio - hidróxido de amonio (50 : 50 : 1 : 5).

PROCEDIMIENTO.

Obtener una placa de papel de 10 X 10 cm. con una línea de aplicación a 1.3 cm.

Con ayuda de un tubo capilar, aplicar el colorante extraído a distancia de 1.5 cm del extremo de la placa, aplicar ahora el colorante patrón procurando queden separados entre sí a distancia de 1 cm.

El número de aplicaciones del colorante de nuestra muestra tratada dependerá de la intensidad de la mancha, mientras que el colorante patrón deberá aplicarse una sola vez sin que el diámetro de la mancha o punto de aplicación exceda los 2 mm.

Colgar la placa de papel dentro de la cámara cromatográfica para evitar evaporación en forma tal que la mancha pueda ser irrigada con la fase móvil hacia arriba por capilaridad. Cuando la fase móvil ha saturado el papel hasta alcanzar 1 cm. de distancia del extremo final de la placa se saca el papel cromatográfico de la cámara para lograr su separación y posterior identificación. En este caso como estamos trabajando con sustancias coloridas la separación es evidente sin el uso de agentes reveladores.

Señalar el frente del disolvente y dejar secar.

5.- IDENTIFICACION DE LOS COLORANTES SEPARADOS.

La fórmula para obtener el R_f es la que sigue:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

donde:

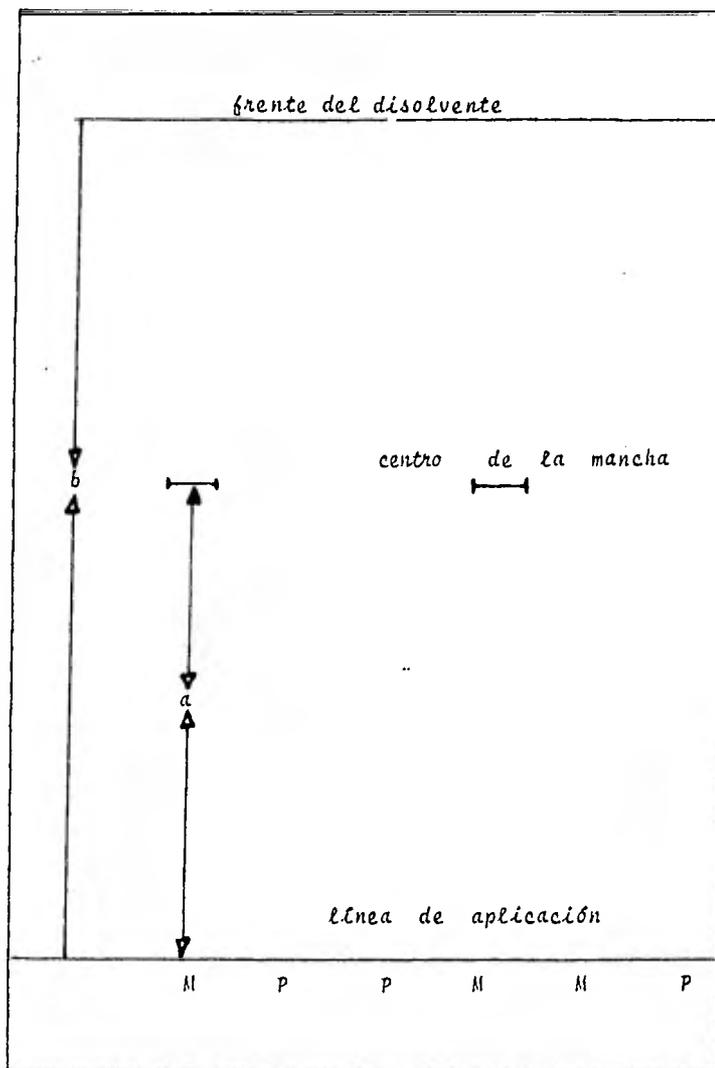
a = distancia que ha recorrido la muestra

b = distancia que ha recorrido el disolvente.

La posición de los colorantes desconocidos de la muestra analizada se compara con la posición de los colorantes estándar. Si el colorante desconocido tiene el mismo valor de " R_f " del colorante estándar es que se trata del mismo tipo de colorante.

GRAFICA QUE MUESTRA
EL VALOR R_f :

33



P = colorante patrón de referencia
M = muestra problema

CAPITULO V
RESULTADOS

P A P E L	Rodamínica	R 3	R 6	R 10	Am 5	Am 6	Azul 2	Violeta	Verde	Todos	Duración Placa
Butanol/Acetato de etilo/ amoníaco. (33 : 37 : 30)	0.96	0.15	-	-	-	-	-	-	-	0.11	mín 20
	0.96	0.10	-	-	-	-	-	0.85	-	0.09 0.09 0.09	mín 90
Isopropanol/agua/cloruro de sodio/hidróxido de - amonio	0.987	0.775	0.787	0.625	0.1	0.875				Am 5 R3 R10 Verde Azul 2 Roda 0.38 0.77 0.83 0.90 0.94 0.97 0.38 0.75 0.83 0.95 0.98	1:20 10x10
50:50:1: (10)	0.98	0.78	0.798	0.88	0.45	0.89	0.97	0.99	0.93	Am 5 R3 R10 Azul 2 0.447 0.79 0.91 0.97 0.41 0.79 0.90 0.97 0.42 0.79 0.90 0.98	2:50 20x20
Isobutanol/etanol/agua (50:100:50)	0.97	0.41	0.75	0.65						0.36 0.60 0.81 0.97	1:45 10x10
		0.65	0.39	0.58	0.29		0.69	0.90	0.66	0.25 0.53 0.66 0.98	L R40 60
	0.97	0.64	0.35	0.52	0.49						L 0.53 0.51 0.51 0.51 R40 65
	0.96	0.64	0.38	0.57	0.29	0.49	0.69		0.65		L 0.51 R40 45
Placa D' Sílica Butanol/acetato (3.3 3.7 3.0)	0.77	0.78	0.85	0.83	0.77	0.78	0.81	0.75	0.87	0.76	30
	4	1.4	1.5	0.8	-	0.7	0.2				15
	4.9	5	3.9	4.6			4.8			Separa a 3 e.	30

ESTRA	MARCA	SABOR	COLOR	EXTRACCION	SEPARACION	RESULTADO
:latina separada	Dany	Limon	verde	L/ac. Acetico	Sep-pak 5 gotas de ac. acetico muestra, eluye Am lavar con agua etanol al 50% eluye el azul.	Am5 y A21
		fresa piña	rojo amarillo	L/ac. Acetico L/ac. Acetico	Cromatografía Cromatografía	R10 Am5
:latina novo	D' Cardii	Limon	verde	L/ac. Acetico	Sep-pak 5 gotas de ac. acetico + muestra, eluye Am lavar con agua etanol al 50% eluye el azul.	Am5 y A21
		fresa piña	rojo amarillo	L/ac. Acetico L/ac. Acetico	Cromatografía Cromatografía	R5 Am5
:lis wero	s/m	naranja fresa	naranja rojo	Directo Directo	Cromatografía Cromatografía	Am6 R10 y R5
		coca	cafe etc.	Directo	Cromatografía	
				L/ac. Acetico	Sep-pak	
:lis	Sonic	fresa uva	rojo morado	L/ac. Acetico L/ac. Acetico	Directo Sep-pak etanol al 10% eluye el rojo lavar con agua etanol al 95% eluye el azul	R10 R10 y A21
		Limon	verde	L/ac. Acetico	Sep-pak aromático al 10% eluye el amarillo lavar con agua etanol al 50% y eluye el azul	Am5 y A21
		naranja	naranja	L/ac. Acetico	Sep-pak aromático 10% eluye el amarillo lavar con agua	Am6 y R10
:lis	Intelecto	fresa uva	rojo morado	L/ac. Acetico L/ac. Acetico	Cromatografía Sep-pak Metanol dil. + la muestra eluye rojo, lavar con agua etanol al 50% para que eluya el azul	R10, Am5 y R5 R10 y A21
		naranja	amarillo	L/ac. Acetico	Cromatografía	Am5
		guayaba	rojo	L/ac. Acetico	Cromatografía	R10

Pálidas	Cozina	naranja	café claro	L/ac. Acético	Sep-pak amoníaco 10% eluye el amarillo lavar con agua etanol al 50% y eluye un rojo.	R10, Am5 y Am6
		uva	morado	L/ac. Acético	Sep-pak etanol al 10% eluye el color rojo lavar con agua etanol al 96% eluye el color azul	R10 y Az1
		jamaica	rojo	L/ac. Acético	Cromatografía	R10
		fresa	rojo	L/ac. Acético	Cromatografía	R10
		limón	verde	L/ac. Acético	Sep-pak amoníaco al 10% saiz el color amarillo lavar con agua etanol al 50% eluye el color rojo.	R10, Am5, Am6 y Az1
Pálidas	Tozumbo	uva	morada	L/ac. Acético	Sep-pak etanol al 10% y eluye el color rojo lavar con agua etanol al 96% y eluye el color azul.	R10 y Az1
Pálidas	Tozumbo	fresa	rojo	L/ac. Acético	Cromatografía	R10
		jamaica	rojo	L/ac. Acético	Cromatografía	R10
		limón	verde	L/ac. Acético	Sep-pak Amoníaco al 10% y eluye el amarillo lavar con agua etanol al 96% y eluye el color azul.	Am5 y Az1
Jugos	Tropizana	naranja	amarillo	L/ac. Acético	Sep-pak 5 gotas de ac. acético eluye el amarillo lavar con agua etanol al 20% y eluye un color naranja	Am5 y Am6
		fresa	rojo	L/ac. Acético	Cromatografía	R10
Jugos	Frutic	naranja	amarillo	L/ac. Acético	Cromatografía	Am6
		manzana	café	L/ac. Acético		s/colorante
		uva	morado	L/ac. Acético	Sep-pak etanol al 10% y eluye un color rojo lavar con agua etanol al 96% y eluye el color azul	R10 y Az1
		mango	amarillo	L/ac. Acético	Cromatografía	Am5 y Am6

<u>MUESTRA</u> MARCA	<u>SABOR</u> COLOR	<u>EXTRACCION</u> SEPARACION	RESULTADO
Jugo Valle 'frutada	piña amarillo	L / ac. clorhldrico cromatografla	Am 5
	uva morado	L / ac. acetico sep - pak	Azul 1, Rojo 10
Jugo Si - Si	tamarindo cafe	L / ac. clorhldrico cromatografla	NO colorante
	manzana rojo	sep - pak .L / ac. clorhldrico	Am 5, Rojo 6
	naranja naranja	L / ac. clorhldrico cromatografla	Am 6
	guayaba rosa	L / ac. clorhldrico cromatografla	Rojo 6
	mango amarillo	L / ac. clorhldrico cromatografla	Am 5, Am 6
Tix - tix s / m	naranja naranja	L / ac. clorhldrico cromatografla	Am 6
	uva morado	L / ac. clorhldrico sep - pak	Azul 1, Rojo 3
	fresa rojo	L / ac. clorhldrico cromatografla	Rojo 6 .

Tix - tix s / m	limón verde	L / ac. clorhídrico sep - pak	Azul 1, Am 5
Panditas Ricolino	piña amarillo	L / ac. clorhídrico cromatografía	Am 5
	naranja naranja	L / ac. clorhídrico cromatografía	Am 6
	limón verde	L / ac. clorhídrico sep - pak	Azul 1, Am 5
Dulcigomas Ricolino	fresa rojo	L / ac. clorhídrico cromatografía	Rojo 3
	piña amarillo	L / ac. clorhídrico cromatografía	Am 5
	mandarina naranja	L / ac. clorhídrico cromatografía	Am 6
Chochitos (gragea acidulada) Ricolino	uva morado	L / ac. clorhídrico sep - pak	Azul 1, Rojo 10, Am 5
Confitones Ricolino	amarillo	L / ac. clorhídrico cromatografía	Am 5, Am 6

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

39

Confitones		L / ac. clorhídrico	
Ricolino	naranja	cromatografía	Am 5, Am 6
		L / clorhídrico	
	verde	cromatografía	Azul 1, Am 5
		L / ac. clorhídrico	
	rojo	cromatografía	Rojo 40, Am .

NOTA * = Los confitones una vez obtenidos por el método de la lana / ac. clorhídrico 0.1 N se filtraron puesto que al extraerlos la solución coloreada toma una opacidad debido quizá a la gran cantidad de talco que poseen.

papel filtro = Whatman No. 42 de 11.0 cm.

Chile	uva	L / ac. clorhídrico	
s / m	morado	sep - pak	Azul 1, Rojo 7,3,6.
	piña	L / ac. clorhídrico	
	amarillo	cromatografía	Am 5
Chilito		L / ac. clorhídrico	
s / m	café	cromatografía	NO colorante
Chilito		L / ac. clorhídrico	
Productos	rojo	cromatografía	Rojo 6
Garzeta			

Borrachitos Reina	rojos	Celita columna	Rojo 19, Rojo 3
Borrachitos Reyes	rojos	celita columna	Rojo 19
Borrachitos La gota de miel	rojos	celita columna	Rojo 19
Alfajor Reina	rojo	celita columna	Rojo 19
Alfajor Reyes	rojo	celita columna	Rojo 19
Alfajor La gota de miel	rojo	celita columna	Rojo 19
Goma de mascar s / m	rosa	celita columna	Rojo 19
Grajeas s / m	rosa	celita columna	Rojo 19
Salchicha pavo	roja	L / ac. acético cromatografía	Am 5, Am 6, Rojo 10 Rojo 3.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

Para la separación de los colorantes sintéticos realizada en diversos tipos de alimentos el sistema de cromatografía en papel resultó ser una técnica sencilla de dominar desde el punto de vista cualitativo; práctica y accesible a un laboratorio de mediano nivel, además de confiable y barata.

La cromatografía en capa fina dio valores de R_f muy por abajo de los valores de R_f de los estándares, no logró separar las mezclas y en comparación con la anterior resultó ser más costosa y laboriosa ya que se tienen que preparar las placas que en este caso fueron elaboradas a base de sílice gel por lo que este tipo de cromatografía no fue elegido.

Para correr las placas se prepararon los siguientes sistemas:

1.- Etanol/ acetato de etilo/ amoníaco.

Este sistema resultó deficiente porque no logró separar las mezclas de los colorantes y sólo unos cuantos estándares lograron dar valores de R_f .

2.- Isobutanol/ etanol/ agua

Este sistema separó pocas mezclas de colorantes y casi todos los estándares presentaron valores de R_f .

3.- Isopropanol/ agua/ cloruro de sodio/ hidróxido de amonio.

Este fue el sistema que se eligió para la separación de los colorantes sintéticos, ya que presentó los valores de R_f de los colorantes más cercanos a los valores

de R_f de los estándares y fue capaz de separar gran cantidad de colorantes existentes en una mezcla.

La aplicación del estándar junto a la muestra se hizo para que la obtención de los resultados fuera más confiable, ya que durante la identificación se observó que existía una pequeña variación en el valor de R_f del mismo colorante de una placa a otra debido a que el sistema fue preparado en varias ocasiones con variación en la temperatura y a la cámara cromatográfica que presentaba una baja saturación después de haber corrido varias placas.

Para llevar a cabo el método de la columna de celita se improvisó una columna de vidrio semejando el tamaño y grosor de la original; dio buenos resultados por tratarse de una técnica cualitativa, además de rápida y efectiva tiene la característica de separar a la rodamina, colorante que se encuentra en algunos alimentos coloreados de rosa intenso.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Pasch J.H., Von Elbe J.H., BETALAINES AS COLORANTS IN DAIRY PRODUCTS, *Food technol*, de January, vol. 38, - No. 1 : pages 25 - 28, 1975.
- 2.- Salfield J.R., EXPERIMENTAL WORK IN FOOD SCIENCE, - first edition, London (Inglaterra), editorial Heinemann educational, 1974.
- 3.- Pearson D., TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL ANALISIS DE ALIMENTOS, primera edición, Zaragoza (España), -- editorial Acribia, 1974.
- 4.- Horgitz William, METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL, eleventh edition, Washington D.C., editorial Analytical Chemists, 1970, pages 576 - 590.
- 5.- Kaminski Jane, CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, *Interbureau*, January, vol. 4, No. 1 : pages 194 - 218, 1970
- 6.- Bargo Eileen, Mack George, DETERMINATION OF COLORANTS IN PRODUCTS BY TLC, *Laboratory information bulletin*, october, vol. 1, No. 2994 : pages 1 of 11, 1985.
- 7.- Valle Vega Pedro, TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS, editado por Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, - Organización Panamericana de Salud, Organización Mundial de la Salud, México, D.F., editorial CECSA, 1986.
- 8.- Randerath Kurt, CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA, ediciones URMO, tomo No. 8, España, Artes gráficas Grijelmo, 1978.

- 9.- W. Desrosier Norman, CONSERVACION DE ALIMENTOS, -- decimotercera edición, México 22, D.F., editorial -- CECSA, 1984.
- 10.- Josse Rene, COLORANTES, en división de vitaminas y productos químicos, Rev. de F. Hoffmann- La Roche & Co., enero de 1986.
- 11.- Graichen Charles, DETERMINACION DE COLORANTES FDC Y COLORANTES NO LISTADOS QUIMICAMENTE SIMILARES EN ALIMENTOS, en divisiones de color technology, Vol. 1, - No. 1 : pag. 1 of 75, 1980.
- 12.- Dirección General de Epidemiología, DETERMINACION - DE COLORANTES ARTIFICIALES POR CROMATOGRÁFIA EN PAPEL, 1984.
- 13.- Egan H., Kirk R.S., ANALISIS QUIMICO DE ALIMENTOS - DE PEARSON, primera edición, México, D. F., editorial continental CECSA, 1987.
- 14.- FARMACÓPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, cuarta edición, México, D.F., editada por la SSA, - 1974.
- 15.- Code of federal regulations, de January, Vol. 1, -- No. 1 : pages 1 a 119, 1971.
- 16.- Graham H.D., THE SAFETY OF FOODS, second edition, Washington, D.C., the avi publishing, 1980.