



TOXI-INFECIONES DE ORIGEN ALIMENTARIO



SEPARACION E IDENTIFICACION DE COLORANTES ARTIFICIALES EN ALIMENTOS

Elsa C. de Reyes

Asesora del Laboratorio Químico, Laboratorio Unificado de Control de Alimentos, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala, Guatemala, C.A.

La mayor parte de naciones del mundo han reglamentado el uso de colorantes artificiales en alimentos, y permitido el uso de un número generalmente reducido de ellos, el cual varía de país a país. Su separación e identificación constituyen el tema del presente trabajo.

Introducción

La aceptación de ciertos alimentos por el público consumidor es determinada en parte por su apariencia, y de ahí la antigua costumbre de colorearlos.

Generalmente, la práctica de colorear los alimentos en forma estable, de modo que durante las etapas de elaboración el color no se deteriore, responde a un motivo estético, pero puede igualmente responder a intenciones de fraude.

La búsqueda de un colorante en un alimento debe tener dos finalidades: descubrir una adulteración sustancial, y determinar si tal o cual colorante es inocuo, perteneciendo, como tal, a la reducida lista de colorantes permitidos.

La identificación de un colorante es tarea difícil, sobre todo si en un alimento dado se encontró algún colorante prohibido que no corresponde a patrones previamente establecidos. Este es el caso de los colorantes sulfonados, solubles en agua. Otro caso de identificación difícil lo constituyen las fluoresceínas del grupo de las eosinas, cuya única diferenciación hasta ahora se ha basado en la determinación del halógeno constituyente.*

En este trabajo se presentan métodos rápidos que no requieren aparatos costosos, sino que se valen de reacciones sencillas y específicas apropiadas para un examen rápido de las muestras.

* La norma para eritrosina ha sido modificada a fin de excluir la presencia de fluoresceína, sustancia de conocida nefrotoxicidad (1).

Generalidades sobre Colorantes Artificiales

Los colorantes son sustancias que al disolverse en un medio son capaces de impartir un color, sin modificar por ello ninguna de las características del mismo (2). Hoy día el empleo de estos aditivos constituye una necesidad comercial, dado que realzan el aspecto de los preparados alimenticios.

En 1886 el Congreso de los Estados Unidos de América autorizó la adición de colorantes artificiales a la mantequilla, y para el año 1900 esta práctica se había generalizado a muchos productos alimenticios. Se fundó entonces la Oficina de Química de la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), para estudiar la naturaleza y característica de los preservativos y colorantes y su relación con la salud.

En 1907 el Dr. Bernhard C. Hease, experto en colorantes, reconoció 7 colorantes sintéticos usados en alimentos. En el período 1916-1929 son 10 los colorantes que figuran en la lista, y en 1938 aparece el acta de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) con 15 colorantes obtenidos del alquitrán de hulla. Durante los años 1939 a 1950 se añaden a la lista 4 colorantes más. Luego, desde 1956 a 1960, se retiran de ella 4 colorantes, basándose en evaluaciones toxicológicas.

De acuerdo con su toxicidad, los colorantes han sido agrupados en 7 categorías por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (3). Esta clasificación se presenta en el Anexo I.

En Centro América y Panamá se aprobaron, para uso alimentario, 14 colorantes sintéticos, pero en el VII Seminario de Control de Drogas y Alimentos para Centro América y Panamá celebrado en Guatemala en junio de 1972, dicha lista se redujo a 5 colorantes (4), de los cuales únicamente tres: amaranto, amarillo crepúsculo F.C.F. y tartrazina corresponden a la categoría A de la clasificación de la FAO/OMS (véase Anexo I). Los dos restantes: indigotina y eritrosina, se encuentran clasificados en la categoría B del mismo Anexo I. Sin embargo, la industria centroamericana sigue usando el azul brillante F.C.F. incluido en la categoría B del Anexo I. Ensayos toxicológicos de este colorante mostraron que inyectado por vía subcutánea, producía sarcomas locales con una frecuencia de 10 a 15%* (5).

Se emplea además el "rosa de bengala" clasificado en la categoría D. No existen datos que permitan evaluar la toxicidad de este colorante (5).

* Se permitió una reevaluación del azul brillante F.C.F., por demostrarse que "muchos aditivos producen un efecto sarcomagénico local, en virtud de sus propiedades físicas tales como actividad superficial, más bien que por su potencial carcinógeno" (1). El resultado de esta reevaluación fue que se le fijara una IDA.

Se ha encontrado esporádicamente rodamina B catalogada en la categoría CIII (Anexo I) y el anaranjado G.G.N., este último prohibido por las normas alimentarias vigentes en Guatemala.

Métodos

El proceso de llegar a caracterizar con exactitud una o varias materias colorantes es a menudo largo y tedioso.

El análisis de mezclas complejas no es sencillo, aun cuando se dispone de métodos cromatográficos y espectrofotométricos, y a pesar de que cada día el uso de colorantes con fines estéticos es más reducido.

Si no se cuenta con métodos estandarizados de trabajo y si en los pasos del proceso analítico de identificación no se incluye al menos un método cromatográfico o espectrofotométrico, los resultados no serán satisfactorios.

La separación por dos o más solventes inmiscibles, como método clásico con identificación individual posterior del colorante o colorantes, es un método oficial útil siempre que se cuide de que la concentración del colorante no sobrepase el límite de 0.1 - 0.5%. La solución que se obtiene de los alimentos coloreados rara vez requiere dilución, pero si se trata del colorante comercial, debe cuidarse de no sobrepasar esta concentración. El pH de la solución debe oscilar alrededor de 2 en medio acético en presencia de un electrolito (por ejemplo, NaCl), para luego someter esta solución a extracciones con alcohol amílico, alcohol amílico en medio clorhídrico, alfa-diclorhidrina, alcohol amílico en medio clorhídrico y H₂O. Luego, las mezclas de colorantes que han sido extraídas en cada solvente orgánico, según su coeficiente de partición, se separan con otros reactivos específicos, y posteriormente los componentes se identifican individualmente.

La cromatografía es la técnica de separación de uso más amplio. La cromatografía circular sobre papel, la ascendente y en capa fina, son igualmente efectivas. Cuando se trata de determinaciones cuantitativas, la cromatografía en columna líquida es adecuada.

La cromatografía sobre papel ha alcanzado en general un auge extraordinario, y a veces es el único medio factible para separar e identificar este grupo complejo de colorantes sintéticos (6). Se ha demostrado (7) que casi todas las marcas de papel de calidad son útiles para los fines de separación cromatográfica (véase Anexo II).

Para la separación e identificación cromatográfica en papel se ha venido utilizando una gran variedad de solventes (Anexo III), desde una solución acuosa al 2% de NH₄OH. Bandelin y Tuschoff (8) usan una solución acuosa al 2% de alcohol isobutílico. Ceresa (9) emplea papel Whatman #1 y dos sistemas de solvente, cloruro de amonio-alcohol butílico-alcohol etílico-agua, y una variante que consiste en el agregado de NH₄OH al sistema anterior.

Todo método sugerido puede ser reemplazado por otros seleccionados convenientemente por expertos.

Como se ha dicho, la identificación positiva de un colorante es casi siempre difícil. Los colorantes azoicos sin sulfonar son más simples de identificar por procedimientos de análisis orgánico cualitativo, no así los sulfonados, debido a que pocas veces pueden obtenerse químicamente puros. A ello se añade el hecho de que en un alimento casi siempre se separan cantidades muy pequeñas de colorantes. En este caso, el análisis se simplifica comparando las propiedades y el comportamiento de la sustancia problema con patrones de reconocida pureza.

Los procedimientos actuales utilizan la cromatografía y la espectrofotometría. Casi siempre se usan ambos; por ejemplo, la presencia de colorantes auxiliares puede impedir la identificación espectrofotométrica del colorante principal. Por este motivo, antes de recurrir a la espectrofotometría, se debe purificar por cromatografía la sustancia problema.

El Rf de una sustancia es un índice difícil de reproducir. En la práctica hay muchos factores incontrolables que hacen del Rf un índice inseguro (10): Entre estos factores cabe citar la edad y composición de la mezcla disolvente, calidad de papel, concentración, pH de la solución, temperatura, dirección, y tipo y calidad de las sustancias auxiliares que acompañan al colorante principal. Para eliminar muchos de los factores citados siempre deben efectuarse ensayos de cromatografía comparativa. Los cromatogramas deben observarse húmedos y secos, y comparar los tonos de color bajo luz diurna y ultravioleta. Puede también observarse el comportamiento específico y las condiciones del ensayo, así como la presencia de impurezas. Ensayos específicos con ácidos y álcalis u otros reactivos apropiados confirman los resultados cromatográficos (véase Anexo IV).

Los requisitos para probar la identidad de un colorante, comparándolo con patrones, pueden resumirse como sigue: distancias de migración idénticas en diversos disolventes; tono igual a la luz diurna y ultravioleta; cambios iguales de color frente a reactivos químicos, etc.

Uno de los medios más útiles de identificación de colorantes lo constituyen los métodos espectrofotométricos usando las tres regiones del espectro.

Para intentar la identificación de un colorante desconocido se usa la región visible del espectro; muchos colorantes presentan en esta región una absorción característica. Los espectros ultravioleta son también de utilidad, pero el más seguro es el espectro infrarrojo. Este ofrece el inconveniente de que la muestra debe estar libre de impurezas, en especial de agua, ya que ésta absorbe radiaciones infrarrojas que enmascaran la absorción del colorante analizado.

En la aplicación de métodos espectrofotométricos, los espectros se obtienen siempre variando los solventes, y si se usa uno solo, se hará en diversas condiciones.

Del estudio de toda la curva resultante y no sólo de la localización de la máxima absorción, es factible obtener una caracterización definitiva.

El amarillo crepúsculo F.C.F. y el anaranjado G.G.N. constituyen un caso difícil de identificación, ya que ambos presentan espectros idénticos en la región visible y ultravioleta. Sin embargo, en el espectro infrarrojo los grupos sulfónicos, presentes en los colorantes, acusan una absorción característica que permite diferenciarlos.

En la identificación de colorantes se ha aplicado infinidad de técnicas. Si se logra obtener suficiente cantidad de colorante del alimento problema, podría intentarse el análisis de derivados cristalinos por difracción con rayos X o cristalografía óptica (10).

Generalidades en el Análisis de Colorantes

Las distintas etapas en el análisis de colorantes son las siguientes: extracción, aislamiento, separación e identificación.

Extracción. Esta constituye la primera etapa en la marcha de la identificación del colorante, y consiste en extraerlo del alimento soporte. El procedimiento de extracción lo determinará la naturaleza del alimento. El agua es el solvente más utilizado, pero debido a que los colorantes se fijan con gran afinidad a ciertas sustancias como productos lácteos, grasas, conservas de carne, etc., es necesario recurrir a solventes orgánicos.

Aislamiento. Una vez extraídos, se les aísla fijándolos por tinción sobre fibras de lana previamente desengrasada, aprovechando la afinidad que los colorantes sintéticos tienen con las fibras textiles. Se ha utilizado igualmente fibras de algodón, seda, etc. Este aislamiento se efectúa generalmente en medio ácido acético o clorhídrico.

Separación. Para desmontar los colorantes fijados, la fibra teñida se trata con soluciones amoniacales cuya concentración varía entre 2 y 25%. Luego las soluciones se concentran para efectuar el ensayo cromatográfico. Este puede ser circular o ascendente, en cilindros de cierre esmerilado o en cámaras apropiadas.

Si en la mezcla de colorantes se encuentra un color azul, se recomienda (11) el uso de $\text{CO}_3(\text{Na})_2$ en lugar de NH_4OH , ya que la indigotina (colorante azul) es destruida por el amoníaco.

Los cromatogramas secos deben observarse comparativamente para determinar el tono del color o colores obtenidos, así como también la intensidad de los mismos. Ambos factores son importantes en el proceso de identificación.

Es necesario comparar las distancias de migración de las manchas de color. Luego de obtener el o los colorantes puros a través de cromatografía

circular o ascendente, se procede a la identificación.

Identificación: Esta puede efectuarse sobre las manchas de color en el papel cromatográfico, o sobre las soluciones acuosas de las mismas. Para este propósito son de utilidad los esquemas de Rota-Buzzi (11), Green (11), Mathewson (11) y Loomis (11). Generalmente ésta se lleva a cabo por exposición de cada colorante a la acción de ácidos y bases fuertes, reactivos específicos, y reacciones de oxidación y reducción. Finalmente, se efectúan los ensayos espectrofotométricos.

Identificación por Esquemas Analíticos y Reacciones (11)

La identificación por estos medios se hace sobre soluciones acuosas del colorante puro procedentes de la purificación por cromatografía, y sobre soluciones acuosas de colorantes patrón usados para comparación.

Esquema de Rota-Buzzi

Este se basa en la estructura de los colorantes (Anexo V). Los ensayos se efectúan sobre solución acuosa o alcohólica en concentraciones de más o menos 1·10,000. A 5 ml de esta solución se agregan de 4 a 5 gotas de HCl y de 4 a 5 gotas de SnCl₂ al 10%. Luego se agita y calienta a ebullición. Después de esta operación pueden presentarse los casos siguientes:

- a) **Decoloración completa.** Si esto ocurre, se neutraliza con KOH; si el colorante no se reoxida después de estas operaciones, pertenece a la Clase I de la clasificación. Esta Clase concierne a colorantes cuya estructura incluye los siguientes grupos funcionales: nitro, nitroso, azoico, oxi-azo e hidrazo. Si el colorante se reoxida, pertenece a la Clase II. Tal es el caso de colorantes indigoídes e indoquinónicos.
- b) **No ocurre decoloración (colorantes no reducibles).** La solución se mezcla con KOH al 20%. Si después de esta operación se produce decoloración o precipitación, el colorante pertenece a la Clase III. Dentro de esta Clase se agrupan los amido derivados del tri- y difenil-metano. Si no se produce decoloración o precipitación, el compuesto corresponde a la Clase IV. Los colorantes no amidados del difenil-metano, oxicetonas y colorantes naturales pertenecen a esta Clase.

Esquema de Loomis

Este esquema se basa en reacciones generales y especiales de los colorantes que el autor agrupa por color.

Esquema de Green

Basado en reacciones de reducción con hidrosulfito de sodio, y de oxidación con persulfato de potasio, en este esquema los colorantes se dividen en básicos, salinos ácidos, e insolubles en agua.

Método de Mathewson

Después del fraccionamiento se efectúan reacciones con cianuro de potasio y reacciones de óxido-reducción con bromo y ácido nitroso (diazotación y copulación).

Métodos Espectrofotométricos (10), Visible y Ultravioleta

A los extractos del colorante tratados con solventes (acetona y agua), en presencia de bicarbonato de sodio 0.05 N y utilizando testigos, se les determina la densidad óptica en las longitudes de onda de máxima absorción. Luego se compara con las curvas correspondientes a patrones de máxima pureza. Este método también es de utilidad para colorantes auxiliares y dosificaciones cuantitativas.

Método Infrarrojo

El espectro infrarrojo se puede obtener de soluciones acuosas del colorante purificado usando celdas especiales. Si es posible aislar el colorante libre de toda contaminación, el espectro puede obtenerse en pastillas de bromuro de potasio. Estas pastillas se preparan homogeneizando 0.5 mg del colorante con bromuro de potasio, previamente secado, en un mortero de ágata. Si la cantidad de colorante fuese muy poca, puede hacerse una micropastilla.

Materiales y Métodos

Las muestras analizadas fueron enviadas por inspectores sanitarios del Departamento de Control de Alimentos de la Dirección General de Servicios de Salud de Guatemala. Los alimentos fueron clasificados como sigue: productos lácteos y grasas; pastas, productos de panadería y repostería; bebidas de todo tipo; confites, jaleas y mermeladas; conservas y embutidos; pescado en salmuera.

A continuación se reseñan los métodos empleados para cada grupo de alimentos.

Productos Lácteos y Grasas

Extracción:	<ul style="list-style-type: none"> a) Con éter de petróleo o gasolina b) Tratamiento del extracto etéreo con una mezcla de ácido acético y agua (1:5 0,5) c) Alcalinización del extracto ácido con NaOH al 25%. d) Reextracción con éter de petróleo e) Evaporación del éter exento de exceso de álcali f) Disolución del residuo en alcohol a 70%.
Aislamiento:	<ul style="list-style-type: none"> a) Fijación sobre fibra de lana en medio acético b) Desmontaje con solución amoniacal al 25%.
Separación:	Cromatografía en papel y como solvente los sistemas 1 y 4 del Anexo III.
Identificación	Comportamiento frente a ácidos y bases fuertes Identificación de la clase Reacción de oxidación-reducción Reacción de diazotación y copulación Reacción con cianuro de potasio Examen espectrofotométrico en las tres regiones del espectro.
Valoración	Con cloruro titanoso o gravimetría.

Pastas, Productos de Panadería y Repostería

Extracción:	<ul style="list-style-type: none"> a) Extracción con acetona b) Eliminación de la acetona y adición de agua caliente al residuo c) Filtración d) En el filtrado acuoso estarán presentes los colorantes naturales o artificiales de la muestra (11).
Aislamiento:	<ul style="list-style-type: none"> a) Fijación sobre lana en medio acético b) Desmontaje con hidróxido de amonio al 25%.
Separación:	Cromatografía ascendente o circular sobre papel, utilizando el sistema de solvente No. 2 del Anexo III.
Identificación:	Comportamiento frente a ácidos y bases fuertes Identificación de la clase Reacción de oxidación-reducción Reacción de diazotación y copulación Reacción con cianuro de potasio Examen espectrofotométrico en las tres regiones del espectro.

Valoración: Por titulación con cloruro titanoso o gravimetría.

Bebidas de Todo Tipo

Extracción: Con agua.

Aislamiento: a) Fijación sobre lana en medio acético
b) Desmontaje con solución amoniacal al 25%.

Separación: Cromatografía ascendente o circular con los sistemas de solventes: 1, 2, 3, 4 y 5 del Anexo III.

Identificación: Comportamiento frente a ácidos y bases fuertes
Identificación de la clase
Reacción de oxidación-reducción
Reacción de diazotación y copulación
Reacción con cianuro de potasio
Examen espectrofotométrico en las tres regiones del espectro.

Valoración: Por titulación con cloruro titanoso o gravimetría.

Confites, Jaleas y Mermeladas

Extracción: Con agua.

Aislamiento: a) Fijación sobre lana en medio acético
b) Desmontaje con solución amoniacal al 25%.

Separación: Cromatografía sobre papel usando los sistemas de solventes: 1, 2, 3, 4 y 5 del Anexo III.

Identificación: Comportamiento frente a ácidos y bases fuertes
Identificación de la clase
Reacción de oxidación-reducción
Reacción de diazotación y copulación
Reacción con cianuro de potasio
Examen espectrofotométrico en las tres regiones del espectro.

Valoración: Por titulación con cloruro titanoso o gravimetría.

Conservas y Embutidos

Extracción: Con alcohol etílico al 80%.

Aislamiento:	a) Fijación sobre lana en medio acético b) Desmontaje en medio amoniacal al 25%.
Separación.	Cromatografía en papel con los sistemas de solventes: 2 y 1 del Anexo III.
Identificación:	Comportamiento frente a ácidos y bases fuertes Identificación de la clase Reacción de oxidación-reducción Reacción de diazotación y copulación Reacción con cianuro de potasio Examen espectrofotométrico en las tres regiones del espectro.
Valoración:	Por titulación con cloruro titanoso o gravimetría.

Pescado en Salmuera

Extracción.	a) Con éter de petróleo en baño de maría b) Filtración y evaporación del éter c) Disolución en gasolina d) Extracción con mezcla de HCl: CH_3COOH -agua (1:5:0,5). e) Alcalinización del extracto ácido con hidróxido de sodio al 25% f) Reextracción con éter de petróleo g) Evaporación del éter exento de exceso de álcali h) Disolución del residuo en alcohol al 70%.
Aislamiento:	a) Fijación sobre lana en medio acético b) Desmontaje con solución amoniacal al 25%.
Separación:	Cromatografía en papel, usando el sistema de solvente 1 del Anexo III.
Identificación:	Comportamiento frente a ácidos y bases fuertes Identificación de la clase Reacción de oxidación-reducción Reacción de diazotación y copulación Reacción con cianuro de potasio Examen espectrofotométrico en las tres regiones del espectro.
Valoración.	Por titulación con cloruro titanoso o gravimetría.

Resultados

Muestras analizadas 196

Colorantes Artificiales Encontrados

Tartrazina (amarillo # 5)	90	
Amarillo crepúsculo F.C.F. (amarillo #6)	64	
Amaranto (rojo #2)	80	
Eritrosina	8	
Indigotina	8	
Azul brillante F.C.F. (azul #1)	26	13.26%
Redomina B	4	2.04%
Rosa bengala	1	
Amarillo ácido G	2	
Anaranjado G.G.N.	4	2.04%
Punzó 4 R	1	
Amarillo naftol S	1	
Amarillo manteca	1	
Amarillo OB	1	

Conclusiones

1. La técnica descrita es rápida y segura como método de rutina.
2. El procedimiento de extracción es lo único que varía para cada grupo de alimentos.
3. En la fase de aislamiento el desmontaje con solución amoniacal al 25% no es aconsejable cuando se sospecha la presencia de colorantes azules, ya que los colorantes de índigo, cuanto menos sulfonados sean se destruyen, y por oxidación, dan isatina. Se recomienda su fijación en medio ligeramente clorhídrico, aunque la indigotina soluble - que es la forma común de empleo - es el derivado disulfonado.
4. Se ha usado anaranjado G.G.N., colorante no permitido en nuestras normas, y cuyo peso molecular, fórmula empírica, clase y reacción frente a reactivos químicos, son iguales que las del amarillo crepúsculo F.C.F. cuyo uso sí es permitido, y cuya única diferencia radica en la posición de un grupo sulfónico.

Los análisis espectrofotométricos en la región visible y en la región ultravioleta son tan parecidos que no se podrían diferenciar. Sin embargo, sus espectros infrarrojos son diferentes en la región del espectro en que los grupos ácido sulfónico absorben fuertemente.

Resumen

En este trabajo se consideran los aspectos siguientes:

- a) Los colorantes cuyo uso se permite en Guatemala, y su clasificación de acuerdo a su toxicidad (véase Anexo I).
- b) La adición de colorantes a los alimentos responde a un motivo estético, pero como también puede responder a intenciones de fraude, la identificación tiene por objeto comprobar estas finalidades.
- c) Se mencionan los principales métodos de identificación, incluyendo los de espectrofotometría infrarroja.
- d) Se incluyen cuadros sintetizando los pasos a seguir en la identificación de los colorantes alimentarios, según la naturaleza del alimento soporte.
- e) En el Anexo V se incluyen las fórmulas estructurales de los colorantes permitidos en Guatemala y los de otros, cuyo uso es prohibido y que han sido encontrados en el trabajo analítico.
- f) En los Anexos III y IV se presentan algunos de los principales sistemas de elución para cromatografía circular o cromatografía ascendente utilizados en la separación y purificación de mezclas de colorantes, y en el Anexo II, las propiedades y velocidades de desarrollo de algunos papeles cromatográficos.

Referencias

1. *Normas de Identidad y Pureza para los Aditivos Alimentarios y Evaluación de su Toxicidad.* 13o Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1970, p. 13-14, 4-5. (FAO: Reuniones sobre Nutrición, Informe No. 46).
2. Baldizón, E. Pernillo de. *Identificación de Colorantes Artificiales en Alimentos.* Tesis de Graduación, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1972.
3. *Normas de Identidad y de Pureza para los Aditivos Alimentarios y Evaluación de su Toxicidad: Colores Alimentarios y Algunos Antimicrobianos y Antioxidantes.* 8o Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, Ginebra, 8-17 de diciembre de 1964. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1966. (FAO: Reuniones sobre Nutrición, Informe No. 38).
4. *Normas Sanitarias de Alimentos.* Cambios acordados oficialmente por el VII Seminario de Control de Drogas y Alimentos para Centro América y Panamá. Guatemala, junio de 1972. Washington, D. C., Organización Panamericana de la Salud, junio de 1972, 14 p. (Servicios Médicos Veterinarios, Higiene de Alimentos Serie No. 1).

5. Suñé, J. Ma. Conservadores y correctivos, antioxidantes, anti-fermentos, correctivos de sabor y olor, colorantes. En: *Enciclopedia Farmacéutica*. Vol. II. Barcelona, España, Científico-Médica, 1963, p. 581.
6. Calzolari, C. & A. D. Furlani. Application of chromatography of the analysis of food constituents. *Rass. Chim.*, 12:27, 1960. (c.f. *Chem. Abst.*, 54, 14489_a.)
7. Villar, B. Cromatografía y electroforesis. En: *Enciclopedia Farmacéutica*. Vol. III. Barcelona, España, Científico-Médica, 1963, p. 252.
8. Bandelin, F. J. & J. V. Tuschhoff. Paper chromatography of some certified dyes. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 49:302, 1960. (c.f. *Chem. Abst.*, 54, 16748_e.)
9. Ceresa, G. Identification of the nature of coal-tar dyes used in the food industry. *Staz. Chim. Agrar. Sper. Torino, Annuar.*, 20:135, 1958-60. (c.f. *Chem. Abst.*, 53, 22553_d.) Véase también Ceresa, G. Identification of synthetic dyes used in the food industry. *Ann. sper. agrar. (Rome)*, 13:545, 1959. (c.f. *Chem. Abst.*, 61, 6260_e.)
10. *Normas de Identidad y de Pureza para los Aditivos Alimentarios*. Vol. II. *Colores Alimentarios*. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1963.
11. Hordh, U. *Las Materias Colorantes en los Productos Alimenticios y Utensilios, Envases, Envolturas, Tejidos, etc.* Buenos Aires, Argentina, El Ateneo, 1955, p. 59, 92, 113, 119 y 144.
12. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. XI ed. Washington, D. C., The Association, 1970.
13. Zweig, G. & J. Sherma. *Paper Chromatography and Electrophoresis*. Vol. II. New York, Academic Press, Inc., 1971, p. 469.
14. *Normas Sanitarias de Alimentos*. Aprobadas por el Consejo de Ministros de Salud Pública de Centro América y Panamá, 1964-1966. Tomo I. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, diciembre de 1967, 400 p. (Servicios Médicos Veterinarios, Higiene de Alimentos Serie No. 1).

ANEXO I

**CLASIFICACION DE LOS COLORES SEGUN LA EVALUACION DE SU
TOXICIDAD POR EL COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN
ADITIVOS ALIMENTARIOS**

"Categoría A. Colores que se ha visto son aceptables para emplearlos en los alimentos. Para estos colores se ha establecido una ingestión diaria admisible máxima.

La inclusión de un color en esta categoría no debe interpretarse en el sentido de que ello signifique que no sea necesario hacer más investigaciones sobre el mismo, pues la prosecución de las investigaciones es precisa, sobre todo en vista de la posibilidad de que el progreso científico permita disponer de medios más exactos y delicados de determinación de la toxicidad de tal color. Son particularmente necesarias nuevas investigaciones en lo que concierne a los efectos de los colores sobre la reproducción y el feto.

En la categoría A se han incluido los colores siguientes:

	<u>C.I. No.</u>	<u>Ingestión diaria admisible para el hombre en mg por kg de peso corporal</u>
Amaranto	16 185	0-1.5
Amarillo ocase F.C.F.	15 985	0-5.0
Tartrazina	19 140	0-7.5

Categoría B. Colores para los cuales los datos de que se dispone no son totalmente suficientes para poder incluir aquéllos en la categoría A.

Categoría C.I. Colores para los cuales los datos de que se dispone son inadecuados para evaluar aquéllos, pero acerca de los cuales existen bastante datos detallados concernientes a los resultados de ensayos prolongados.

Categoría C.II. Colores para los cuales los datos de que se dispone son inadecuados para evaluar aquéllos, y acerca de los cuales prácticamente no existen datos referentes a la toxicidad prolongada. Se consideran incluidos en esta categoría los ensayos prolongados, hechos para descubrir la formación de tumores, que no van acompañados de otros estudios prolongados.

Categoría C.III. Colores para los cuales los datos de que se dispone son inadecuados para evaluar aquéllos, pero que indican la posibilidad de

efectos perjudiciales.

Categoría D. Colores para los cuales prácticamente no se dispone de datos sobre su toxicidad.

Categoría E. Colores que se ha visto son perjudiciales y que no deben usarse en los alimentos."

ANEXO II

PROPIEDADES Y VELOCIDAD DE DESARROLLO DE
ALGUNOS PAPELES CROMATOGRÁFICOS

Papel de filtro	Textura	Velocidad de desarrollo
Whatman No. 1	Media	190 min.
Whatman No. 3	Gruesa	210 min.
Whatman No. 11	Fina	260 min.
Schleicher & Schull 595	Media	180 min.
Schleicher & Schull 507	Lisa	240 min.
Schleicher & Schull 602	Media	270 min.
Eaton & Dickemann 7	Media	120 min.
Eaton & Dickemann 248	Muy gruesa	240 min.
Eaton & Dickemann 613	Muy gruesa	180 min.
Munktell 0	Gruesa	60 min.
Munktell IF	Muy gruesa	80 min.

La velocidad de desarrollo se refiere a los minutos necesarios para ascender 120 mm un disolvente de tipo fenol-agua a 26°C.

Tomado de *Enciclopedia Farmacéutica*, Vol. III, p. 252 (7).

SISTEMAS DE SOLVENTES CROMATOGRAFICOS USADOS EN
LA SEPARACION DE COLORANTES (10, 12, 13)

Para papel:

1. Piridina-acetato de etilo-agua (1:2.2).
Util para mezclas múltiples y para colores amarillos.
2. Alcohol isoamílico-alcohol etílico 95%-hidróxido de amonio-agua (4:4:1:2) para colorantes rojos.
3. Hidróxido de amonio-alcohol isobutílico 3.9 N.
Util para mezclas azules y verdes.
4. Metil etil cetona - acetona - agua (7:3:3 v/v).
5. Metil etil cetona - acetona - agua hidróxido de amonio (7.3:3:002)
para mezclas múltiples. Para colorantes naranja.
6. N-butanol - ácido acético - agua (20:5:12 y 4:1:5 v/v).
7. Isobutanol - etanol - H₂O (3:2 2 v/v). A 99 ml de esta mezcla añáda-se 1 ml de NH₄OH.
8. Fenol - H₂O (80:20 p/p).
9. Acetato de etilo - piridina - agua (11.5:4 v/v).
10. Citrato trisódico (2 g) H₂O (95 ml) y NH₄OH (5 ml).
11. Propanol - 5 N NH₃ (4:1 v/v).

Para placas de gel de sílice:

12. Metanol - cloroformo - quinolina (4:4 2).
13. Metanol - cloroformo - agua - quinolina (4:2:2:2).
14. 2-Propanol - cloroformo - agua - dietilamina (50 25:20:15).
15. 2-Propanol - 0.88 (NH₄15) (4:1).
16. 1-Butanol - agua - etanol - quinolina (4.4:3.2).

Para placas de celulosa:

17. 1-Butanol - agua - piridina - etanol (4.4:2 2).
18. Etil metil cetona - acetona - agua - 0.88 NH₄OH (70 30:30.0.5).
19. 1-Butanol - agua - ácido acético glacial (20.12:10).
20. 1-Propanol - acetato de etilo - agua (6:1:3).
21. 2-Metil - 1-propanol - agua - etanol - 0.88 NH₄OH (25 25:50:2).
22. Citrato trisódico (29 g), hexamina (5 g), agua (50 ml), metanol (50 ml).

ANEXO IV

TABLA DE RF Y DE MAXIMA ABSORCION DE COLORANTES

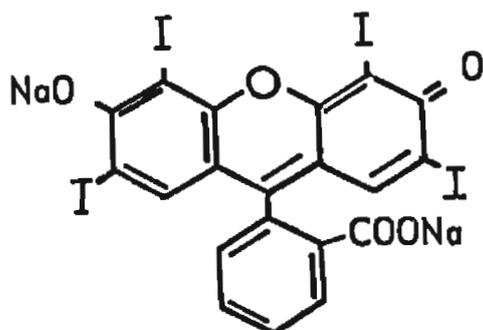
Clase		RF Solvente						Principales picos espectrofotométricos $m\mu$
		1	2	3	4	5	6	
Ponceau MX	AZO	0.47	0.05	0.31	0.40	0.53	0.69	500 en ácido
Ponceau 4R	AZO	0.95	0.36	0.42	0.29	0.33	0.29	505 en ácido
Amaranto	AZO	0.77	0.06	0.20	0.24	0.19	0.20	520 en ácido
Eritrosina (Erythrosine BS)	Xanteno	0.23	0.00	0.70	1.00	1.00	0.68	525 en álcali
Naranja G (Orange G)	AZO	1.00	0.59	0.70	0.53	0.52	0.58	475 en ácido
Naranja RN (Orange RN)	AZO	0.33	0.05	0.82	0.84	0.68	0.78	485 en ácido
Amarillo crepúsculo (Sunset Yellow S)	AZO	0.78	0.26	0.65	0.49	0.45	0.56	480 en ácido
Tartrazina	Pirazolona	1.00	0.26	0.30	0.26	0.18	0.22	430 en ácido
Amarillo ácido (Yellow 2G)	Pirazolona	1.00	0.83	1.00	0.74	0.52	0.48	400 en ácido
Amarillo RY (Yellow RY)	AZO	0.85	0.21	0.17	0.19	0.11	0.04	435 en ácido
Verde S (Green S)	Trifenil metano	1.00	0.88	1.00	0.73	0.57	0.50	635 en ácido
Indigotina (Indigo carmine)	Indigo		0.07	0.30	0.28	0.21	0.27	285 615 en ácido
Amarillo naftol S (Naphtol Yellow S)	Nitro	0.78	0.31	0.68	0.52	0.53	0.56	370 en ácido

Solventes.	1. Hidróxido de amonio-agua	1 99
	2. Cloruro de sodio	2.5%
	3. Cloruro de sodio 2% en alcohol al	50%
	4. Isobutanol-alcohol etílico-agua	1:2:1
	5. N-butanol-agua-ácido acético glacial	20 12:5
	6. Isobutanol-etanol-agua	3:2 2 y 1 ml de NH_4OH para 99 ml de la mezcla anterior.

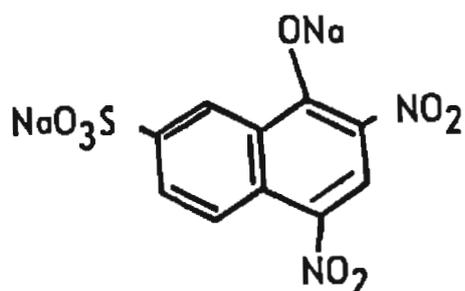
Tomado de: *Normas Sanitarias de Alimentos*. Aprobadas por el Consejo de Ministros de Salud Pública de Centro América y Panamá, 1964-1966, p. 34 (14).

ANEXO V

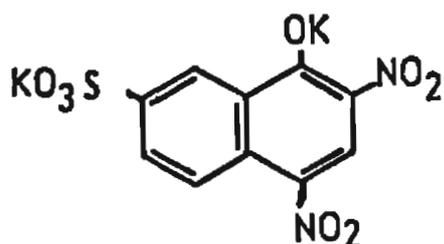
COLORANTES SINTÉTICOS DE USO LIMITADO O ELIMINADOS
EN LOS ESTADOS UNIDOS



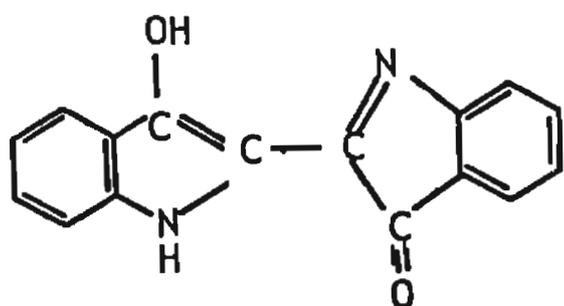
ERITROSINA:
(FD&C Red No. 3)
p.m.: 879.9
C.I. 45430
(xantina)
Actualmente en uso



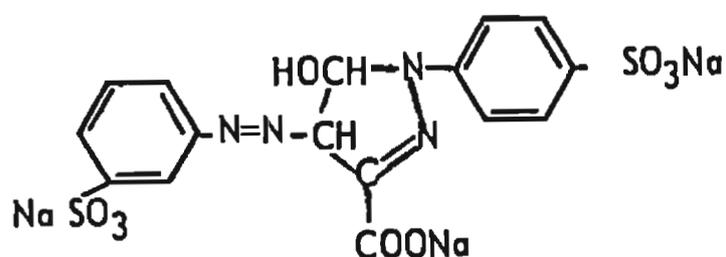
AMARILLO NAFTOL 5:
(FD&C Yellow No. 1)
p.m.: 358
C.I.: 10316
Ext. D&C Yellow No. 9 (1959)
Eliminado completamente (1962)



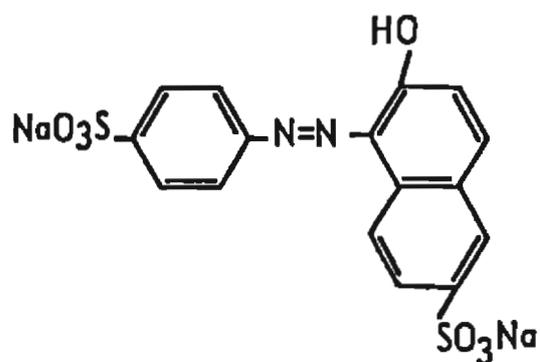
AMARILLO NAFTOL 2:
(FD&C Yellow No. 2)
p.m.: 390
C.I.: 10316
Ext. D&C Yellow No. 7 (1959)
Eliminado para uso en alimentos (1959)



INDIGOTINA:
(FD&C Blue No. 2)
p.m. 466.4
C.I.: 73015
(indigoide)
Actualmente en uso



TARTRAZINA:
(FD&C Yellow No. 5)
p.m. 534.4
C.I. 19140
(pirazolona)
Actualmente en uso

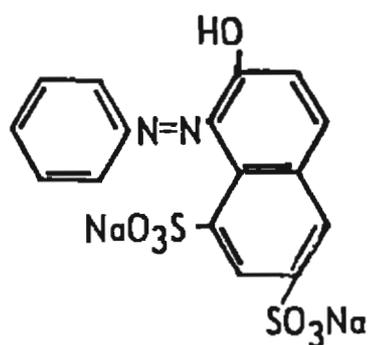
**AMARILLO CREPUSCULO FCF**

(FD&C Yellow No. 6)

p.m.: 452.4

C.I.: 15985 ~

(monoazo)

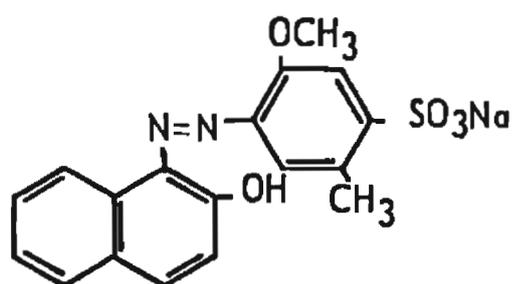
Actualmente en uso**NARANJA G**

(anaranjado ácido G)

p.m.: 452.4

C.I.: 16230

(monoazo)

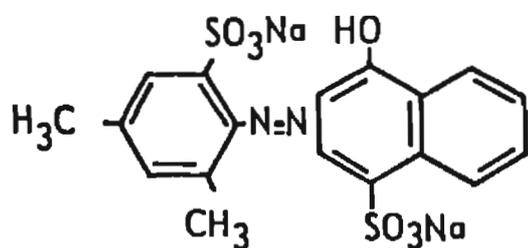
Actualmente en uso**ROJO ALLURA AC**

(FD&C Red No. 40)

p.m.: 496.4

C.I.: - - -

(monoazo)

Actualmente en uso**PUNZO SX**

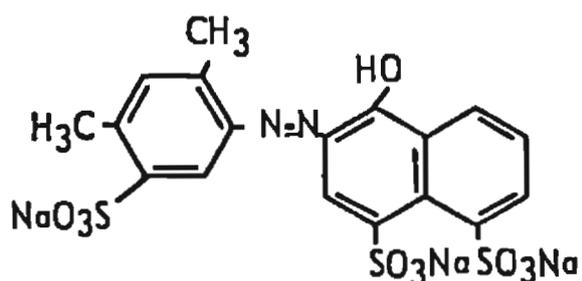
(FD&C Red No. 4)

p.m.: 480.4

C.I.: 14700

(monoazo)

Su uso en alimentos está limitado para colorear guindas. (No más de 150 ppm en peso)

**PUNZO 3R**

(FD&C Red No. 1)

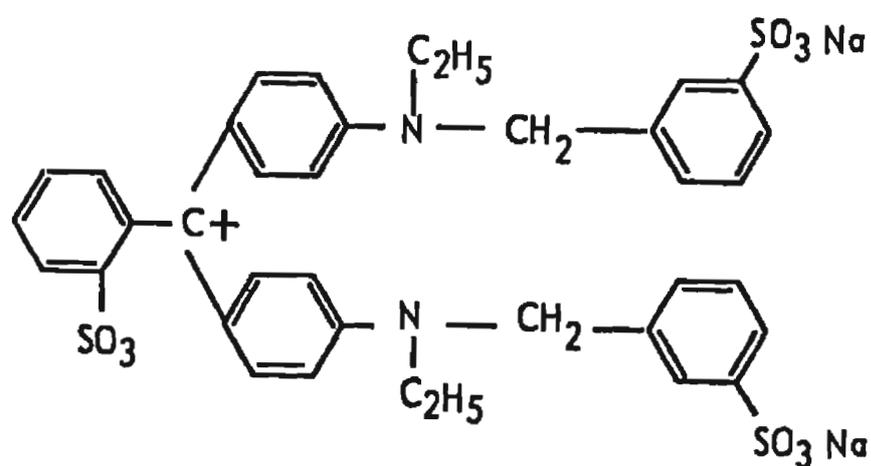
p.m.: 494.5

C.I.: 16155

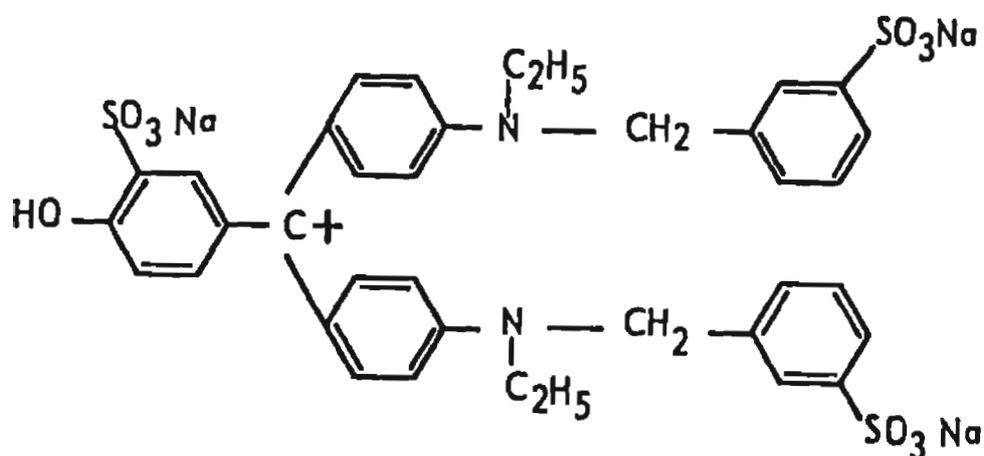
(monoazo)

Ext. D&C Red No. 15 (1961)

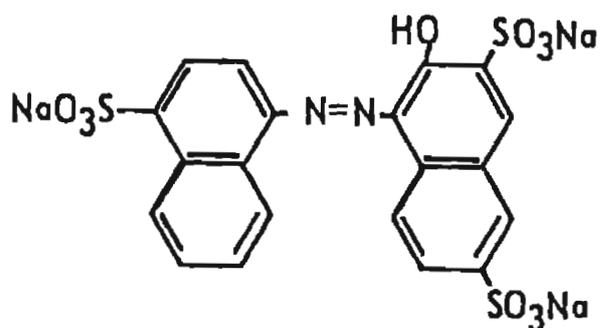
Eliminado completamente en 1966



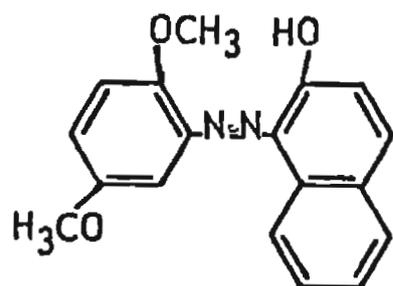
AZUL BRILLANTE FCF
(FD&C Blue No. 1)
p.m.: 792.8
C.I.: 42090
(trifenilmetano)
Actualmente en uso



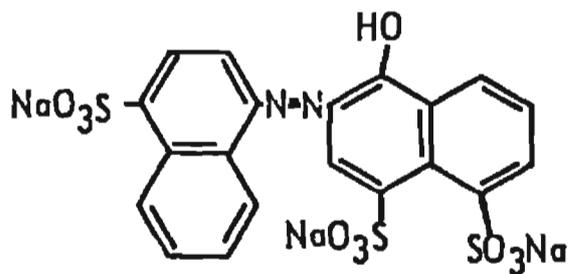
VERDE FIJO FCF:
(FD&C Green No. 3)
p.m.: 808.9
C.I.: 42053
(trifenilmetano)
Actualmente en uso



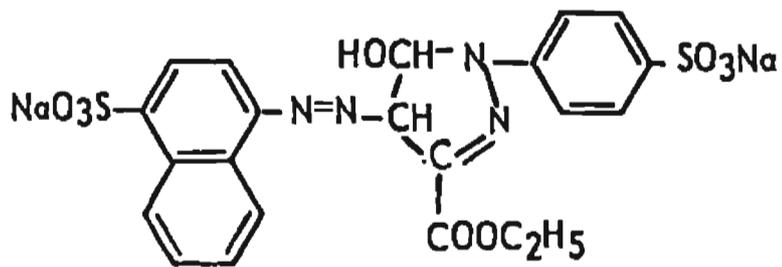
AMARANTO:
(FD&C Red No. 2)
p.m.: 604.5
C.I.: 16185
Actualmente en uso
(la FDA está revisando su posición)



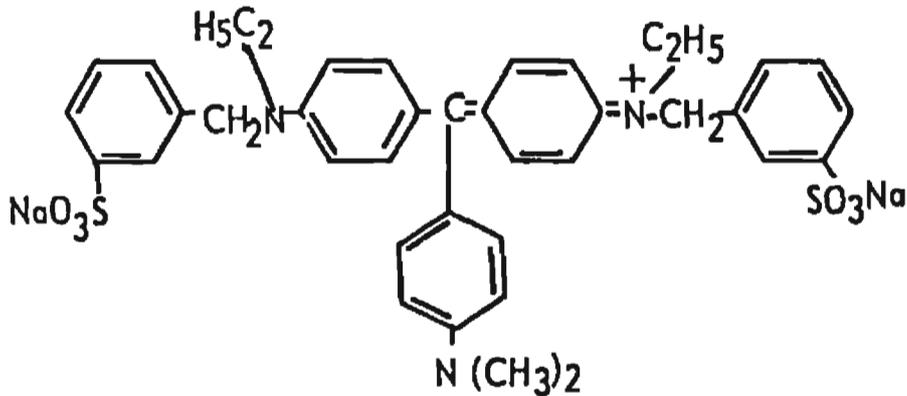
ROJO CITRUS No. 2
(Citrus Red No. 2)
p.m.: 590.5
C.I.: 12156
(monoazo)
Su uso en alimentos está limitado para colorear la piel de las naranjas (No más de 2 ppm en peso)



PUNZO 4R
 (Brilliant Scarlet 4R)
 p.m.: 504.5
 (monoazo)
 C.I.: 16255



NARANJA B:
 p.m.: 586.4
 C.I.: - - -
 (pirazolona)
 Su uso en alimentos está limitado para colorear las cubiertas de salchichas y salsas (No más de 150 ppm en peso)



VIOLETA DE LANA 5BN:
 (FD&C Violet No. 1)
 p.m.: 733.9
 C.I.: 42640
 (trifenilmetano)
Actualmente en uso