

Tesis de Posgrado

Diferenciación por cromatografía sobre papel, de colorantes certificados, para uso alimentario, y colorantes industriales

Wiernik, Miguel

1958

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wiernik, Miguel. (1958). Diferenciación por cromatografía sobre papel, de colorantes certificados, para uso alimentario, y colorantes industriales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0960_Wiernik.pdf

Cita tipo Chicago:

Wiernik, Miguel. "Diferenciación por cromatografía sobre papel, de colorantes certificados, para uso alimentario, y colorantes industriales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1958.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0960_Wiernik.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DIFERENCIACION POR CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL, DE COLORANTES
CERTIFICADOS (PARA USO ALIMENTARIO) Y COLORANTES INDUSTRIALES

Trabajo de tesis presentado por

MIGUEL WIERNIK

para optar al título de Doctor en Química

TESIS: 960

BUENOS AIRES

1958

760

A MIS PADRES

No puedo dejar de agradecer la ayuda prestada por mi padrino de tesis, Dr. Adolfo L. Montes, así como la de los Dres. Pedro Cattáneo, Arnoldo Buspini, Walter Jung e Isidoro Macció de la Dirección Nacional de Química.

También quiero destacar las facilidades brindadas por I.Q.M. Duperial S.A.I.C. para la realización de este trabajo, así como la eficaz y amable colaboración de todo el personal de sus Secciones Anilinas y Publicidad.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1.- Los colorantes de síntesis en los alimentos: aspecto higiénico y legal: Colorantes admitidos, con certificado e industriales; intermediarios de síntesis.

El uso de colorantes de síntesis derivados del alquitrán de hulla para colorar alimentos es una práctica que ha adquirido gran difusión en las últimas décadas.

Esta misma difusión planteó un nuevo problema: Como era sabido que la fijación de un colorante sobre la sustancia celular provoca la muerte de la célula, era necesario averiguar cuáles especies químicas no poseían esta propiedad (Colorantes vitales). Una vez hecho esto, y adelantados los estudios, se comprobó que de la lista original era necesario eliminar numerosos colorantes, por poseer éstos propiedades carcinogénicas. Como al mismo tiempo se comenzó a legislar al respecto, los distintos países adoptaron diversos criterios en la forma de encarar el problema: 1) Los países de reducida vida científica propia se decidieron por una total apatía o por una simple copia de legislaciones más avanzadas; 2) El resto siguió principalmente dos caminos: a) Eliminación de las listas originales de aquellos colorantes cuya toxicidad se ha hecho evidente (EEUU). Esto trae como consecuencia una reducción de los productos utilizables, y por lo tanto la búsqueda de nuevas especies químicas inocuas; y b) Un criterio totalmente opuesto al anterior y que consiste en permitir preferentemente el uso de aquellos colorantes cuya inocuidad haya sido probada fehacientemente en experimentos de laboratorio (RFA). Como por el momento estos últimos son escasos (unos siete), se han agregado provisionalmente algunos más cuyo estudio avanzado permite predecir su falta de toxicidad.

Al mismo tiempo, en la Europa Occidental se nota una tendencia hacia

la unificación de legislaciones. Expresión de ello es el Pacto a Cinq, estipulado en marzo de 1954 entre Bélgica, Francia, Gran Bretaña, Holanda y Luxemburgo (1). Sin embargo, todavía no se lo ha aplicado, pues la lista aprobada tiene numerosas reservas (seis, sobre un total de quince colorantes). Esto se debe - probablemente - a intereses comerciales, pues ningún país produce todos los colorantes propuestos, y cada uno trata de obtener las condiciones más ventajosas para su industria.

Paralelamente se realiza una actividad extraoficial, de corte más científico, que consiste en reuniones internacionales, como la que se ha realizado en mayo de 1954 en Bad-Godesberg (1), (2), y las organizadas por la Organización Mundial de la Salud (3), (4). Las listas aprobadas en algunas de estas reuniones pueden verse en el cuadro I.

Colorantes admitidos

Observando el cuadro I, podemos ver que las legislaciones se guían principalmente por dos criterios: 1) El extensivo, como es el caso de la Gran Bretaña que, con un número de 32 colorantes permitidos, trata de satisfacer todas las necesidades del usuario, aun a riesgo de crearse dificultades en el contralor, como en el caso de las mezclas, que deben tener una composición constante; y 2) El restringido - que es el adoptado por la mayoría de los demás países - que permite la venta y utilización de unos pocos colorantes de cada tipo, desentendiéndose de los problemas que crean con este criterio.

Estudiando la lista que aprueba nuestro Reglamento Alimentario (5), vemos que aun subsisten en ella colorantes que han sido eliminados por las legislaciones de los demás países. Estos son: Naranja I, Punzó 2R, Rosa Bengala y Azul Patente, que ni siquiera figuran en el Colour Index como colorantes usuales para alimentos (6). Todos éstos son, hoy día, reputados como tóxicos, y se consumen libremente en nuestro país, con las consecuencias que son de esperar.

CUADRO I

I. cod	Nombre	P.C	B-G	E.O	Arg	G.B	RPA	REJU	Gr.	Mull	Sch.	C.I.	Sch.	C.I.	
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
AMARILLOS															
1	Amarillo Naftol S, Citronina	##	-	#	#	#	-	FD&C ly2	4	946	7	10	19	10316	
2	Amarillo Sólido, Amarillo Acido R	#	##	##	-	-	#	-	8	918	137	16	172	13015	
3	Sunset Yellow FCF, Amar. Anar. S	##	##	##	#	#	#	6	-	-	-	-	-	15985	
4	Tartrazina, Amarillo Limón A	##	##	##	#	#	#	5	94	948	23	640	737	19140	
5	Amarillo 2G	-	-	-	-	#	-	-	-	-	22	639	736	18965	
6	Amarillo RFS	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	13011	
7	Amarillo 27175 N	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	13445	
8	Crisofina, Tropeolina O	-	#	-	-	-	#	-	84	830	143	148	186	14270	
9	Amarillo KY	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	14330	
10	Oil Yellow AB	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	22	30	11380	
11	Oil Yellow OB	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	61	75	11390	
12	Oil Yellow XP	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	12740	
13	Amarillo Quinolina	#	#	#	-	-	#	-	667	-	613	801	918	47005	
ANARANJADOS															
1	Naranja RN, Naranja Crocefina G	-	-	-	-	#	-	-	13	807	37	26	36	15970	
2	Naranja GGL, GGN, GGP	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	15980	
3	Oil Yellow GG, Sudán G (M)	-	-	-	-	#	#	-	10	536	35	23	31	11920	
4	Naranja C	-	-	-	-	#	-	-	14	-	38	27	39	16230	
-	Naranja I, Tropeolina OOO N ² 1	-	-	-	-	#	-	-	85	871	144	150	185	14600	
ROJOS															
1	Punzó SX	##	-	#	-	#	-	4	-	-	-	-	-	14700	
2	Escarlata GN, Rojo Salmafín G	-	##	##	-	-	#	-	-	-	-	-	-	14185	
3	Carmoisina, Azorubina	##	#	#	-	#	#	-	103	783	163	179	208	14720	
4	Rojo Sólido E. Rojo Naftol GR	#	#	#	-	-	#	-	105	-	166	182	210	16045	
5	Punzó MX (M)	-	-	-	-	#	-	-	55	834	82	79	85	16150	
6	Punzó 3R, Punzó 4R	-	-	-	-	#	-	1	56	833	83	80	100	16155	
7	Rojo Cochinilla A, Punzó 4R	##	##	##	-	#	#	-	106	826	169	185	213	16255	
8	Punzó 6R, Escarlata 6R	-	#	-	-	-	#	-	108	846	170	186	215	16290	
9	Amaranto, Rojo Naftol S, Burdeos S	##	#	#	#	#	#	2	107	811	168	184	212	16185	
10	Rojo 2G, Azogeranina	-	-	-	-	#	-	-	-	-	42	31	40	18050	
11	Rojo 6B	-	-	-	-	#	-	-	-	-	66	57	110	18055	
12	Azofucsina, Rojo 10 B	-	-	-	-	#	-	-	21	-	41	30	38	17200	
13	Rojo FB	-	-	-	-	#	-	-	-	-	194	225	277	14780	
14	Eritrosina	##	##	##	#	#	#	3	517	1113	592	773	887	45430	
15	Rodamina B, Rosa B	-	-	-	-	#	-	-	504	1001	573	749	864	45170	
16	Rojo Ceres, Rojo Somalia APG	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	12150	
-	Punzó 2R, Punzó R, G, GR	-	-	-	-	#	-	-	55	884	82	79	85	16150	
-	Rosa Bengala (dicloro)	-	-	-	-	#	-	-	520	1109	595	777	889	45435	
-	Rodamina 6G	-	-	-	-	#	-	-	-	-	571	752	866	45160	
VIOLETAS															
1	Violeta 5BN	-	-	-	-	#	-	-	468	307	530	698	806	42650	
2	Violeta Acido 6B, V. Bencilo 4B	#	-	#	#	#	-	1	-	-	529	697	805	42640	
AZULES															
1	Indigotina, Indigo Carmin	##	#	#	#	#	#	2	692	94	877	1180	1309	73015	
2	Azul Brill. FCF, Erioglaucina A	-	-	-	-	-	-	1	436	287	506	671	770	42090	
3	Azul VR	-	-	-	-	#	-	-	-	-	507	672	769	42045	
-	Azul de Indantreno R	#	-	#	-	-	#	-	-	-	837	1106	1228	69800	
-	Azul Patente V	-	-	-	#	-	-	-	440	277	543	712	826	-	
VERDES															
1	Verde Guinea B, Verde Acido G	-	-	-	#	-	-	1	433	259	502	666	764	42085	
2	Verde Acido J, V. Lus SF amarill.	-	-	-	#	-	-	2	435	257	505	670	765	42095	
3	Verde Sólido FCF	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	42053	
4	Verde B, S	-	-	-	-	#	-	-	-	-	566	737	836	44090	
PARDOS															
1	Pardo PK, OH (M)	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	Pardo Chocolate FB, N (M)	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	Pardo Chocolate HT (M)	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	20285	
NEGROS															
1	Negro Brillante BN, Negro PN	#	##	##	-	#	#	-	-	-	-	-	-	28440	
-	Negro 5410	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NOTAS AL CUADRO I

- a) Los números de esta columna corresponden a la clasificación técnica del tomo I de la segunda edición del Colour Index. (6)
- b) En esta columna se indican los nombres comerciales más difundidos. Cuando están subrayados, se trata de nombres científicos.
- c) Colorantes aprobados por el Pacto a Cinq. Marzo de 1954 (1).
- d) Colorantes aprobados en el Symposium Europeo de Bad-Godesberg. (1), (2)
- e) Lista provisoria propuesta por el Subcomité de expertos encargado del control de los productos alimenticios de la Europa Occidental (7)
- f) Colorantes permitidos en la República Argentina. (5)
- g) Colorantes permitidos en la Gran Bretaña. (8), (9)
- h) Colorantes permitidos en la República Federal Alemana. (10)
- i) Colorantes permitidos en los EE. UU. de Norteamérica. (11), (12), (13)
- j) Número correspondiente a las tablas de Green (14).
- k) Número correspondiente a las tablas de Mulliken. (15)
- l) Número correspondiente a las tablas de Schultz de 1914 (16)
- m) Número correspondiente a la primera edición del Colour Index. (17)
- n) Número correspondiente a las tablas de Schultz de 1931 (18)
- o) Este número corresponde a la clasificación química del tomo III de la segunda edición del Colour Index. (6)
- #) Con un asterisco se indican los colorantes permitidos o aprobados por las legislaciones y conferencias citadas, excepto en la de los EEUU, donde se ha incluido el número de clasificación que los distingue.
- ##) Se indican así los colorantes que han sido aprobados sin reservas en las conferencias citadas, mientras que los que tienen un solo asterisco, todavía suscitan algunas dudas acerca de su inocuidad.
- M) No se trata de especies químicas puras, sino de mezclas más o menos complejas.

Colorantes con certificado e industriales.

Todo lo dicho hasta ahora se refiere a las propiedades tóxicas de las especies químicas en sí, pero queda en pie otro problema, y es el de la pureza de estos colorantes.

Los colorantes usados en las industrias tintóreas son muy impuros. Estas impurezas provienen tanto de los mismos intermediarios utilizados, como de reacciones incompletas que dejan en libertad apreciables cantidades de éstos. Además, se producen contaminaciones con plomo, cinc o cobre, provenientes de las instalaciones industriales. Finalmente, para normalizar o disminuir la concentración de colorante, se suele agregar sulfato de sodio que, si proviene de la fabricación de ácido clorhídrico, puede contener arsénico.

Como evidentemente estos productos no pueden utilizarse para la alimentación, las industrias del ramo preparan un tipo especial a partir de intermediarios puros, reemplazando los metales de las instalaciones por porcelana, vidrio, caucho, etc.. Finalmente se analizan, se envasan herméticamente y se sellan, dándoles esta garantía el nombre de "colorantes certificados". (19)

En la legislación existen los llamados "Índices de pureza" que sirven para determinar si un colorante es apto o no para uso alimentario, pero una vez que ha sido incorporado al alimento, estas determinaciones no tienen ningún valor.

Intermediarios de síntesis.

Se presenta así el problema de determinar la calidad de un colorante ya incorporado a un alimento. Ello sólo podrá hacerse mediante la búsqueda de sustancias que acompañen al primero y que bajo ningún concepto puedan estar presentes naturalmente en un producto comestible. Las únicas sustancias que cumplen con este requisito son los intermediarios de sín-

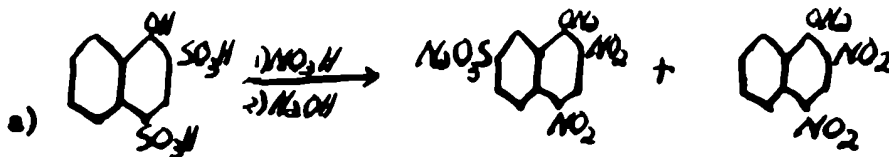
tesis y sus impurezas orgánicas.

Se han estudiado los intermediarios presentes en los colorantes certificados. Una muestra de ello es el trabajo de Harrow y Heine (20), que aplican una separación en columna cromatográfica, y una determinación cuantitativa mediante absorción en el ultravioleta. Pero éste es un método de investigación y no de contralor. Para esto último, sería interesante disponer de alguna técnica cómoda - por ejemplo, basada en la cromatografía sobre papel - para diferenciar colorantes certificados de industriales. Es lícito suponer que los primeros - por ser más puros - deben tener una menor proporción de intermediarios de síntesis.

De los trece colorantes aprobados por nuestro Reglamento Alimentario, uno de ellos - el Amarillo Crepúsculo FCF - no se produce en calidad industrial, y por lo tanto lo descartamos. Describiremos a continuación los doce restantes (5) y sus métodos industriales de preparación (17), y así se podrán apreciar los intermediarios cuya presencia es posible en estos productos.

I) Amarillo Naftol 8: 2:4-dinitronaftol-7-monosulfato de sodio o potasio.

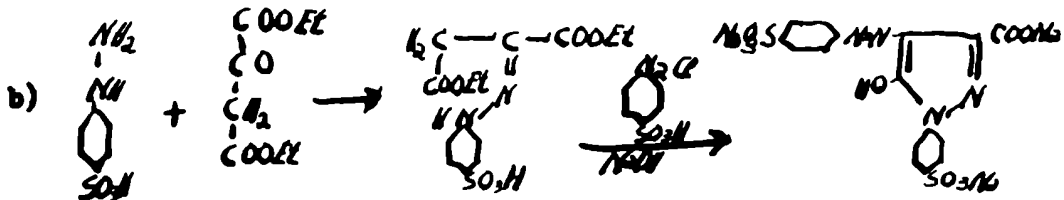
Se produce por nitración de: a) alfa-naftol en diversos grados de sulfonación (2:4, 2:7, 2:4:7) y b) 4-nitroso-alfa-naftol-2:7-disulfónico. Se forma al mismo tiempo cierta cantidad de Amarillo Martius (2:4-dinitro-alfa-naftol)



II) Tartragina: Sal sódica del ácido 4-p-sulfobenceno-azo-1-sulfofenil-5-hidroxipirazol-3-carboxílico.

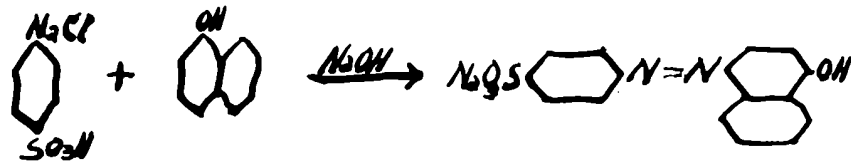
a) Por reacción entre dos moles de ácido p-hidrazino-benceno-sulfónico con un mol de ácido dioxálico, con pérdida de tres moles de agua.

b) Por reacción de un mol de ácido p-hidrazino-benceno-sulfónico con un mol del éter oxalagético. El producto se copula con el diazoico del ácido sulfanílico y luego se saponifica con hidróxido de sodio.



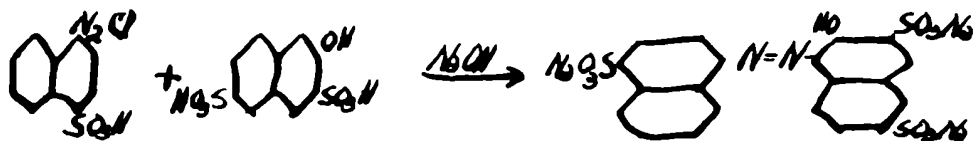
III) Maranja I: Alfa-naftol-asobenceno-4-sulfonato de sodio.

Por copulación del alfa-naftol con el diazoico del ácido sulfanílico.



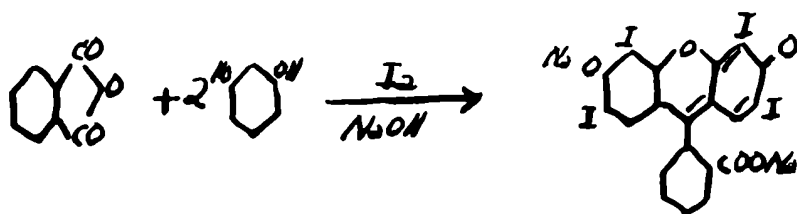
IV) Amaranto o Rojo Burdeos: Alfa-naftaleno-4-sulfonato de sodio-azo-beta-naftol disulfonato de sodio R.

Por copulación del diazoico del ácido naftiónico (alfanaftilamino-4-sulfónico) con el ácido R (betanaftol-3:6-disulfónico).



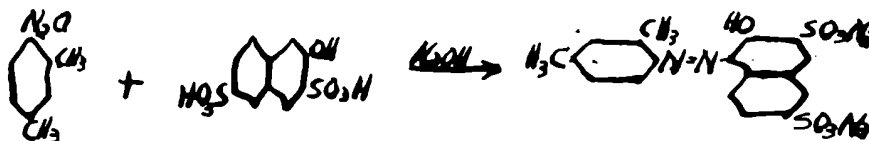
V) Eritrosina: Tetraiodofluoresceína sodada.

Se llega a ella haciendo reaccionar el anhídrido ftálico con resorcina (fluoresceína) y tratando luego con yodo.



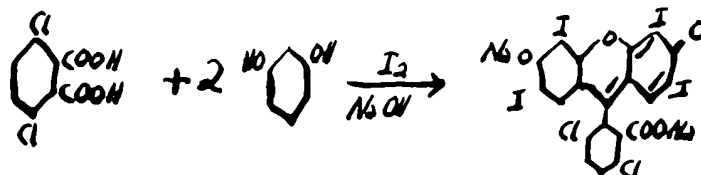
VI) Pungó 2R: p-xileno-azo-betanaftol disulfonato de sodio R.

- a) La especie química pura se prepara copulando el diazotico de la m-xilidina con el ácido R.
- b) El producto usado comunmente se prepara a partir de una mezcla de isómeros de la xilidina.



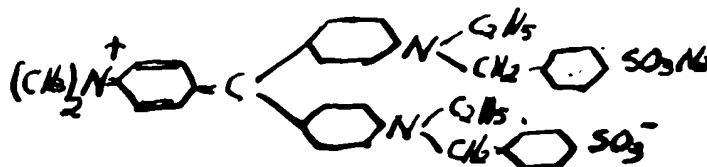
VII) Rosa Bengala: Tetraiodo-dicloro-fluoresceína sodada.

Se hacen reaccionar un mol de ácido 2:5-dicloro-o-ftálico con dos moles de resercina, y el producto se trata con iodo en presencia de clorato de potasio y cloruro cúprico.



VIII) Violeta Acido 6B: Dimetil-dietil-dibencil-tri-p-amidotrifetilcarbimel disulfonato de sodio.

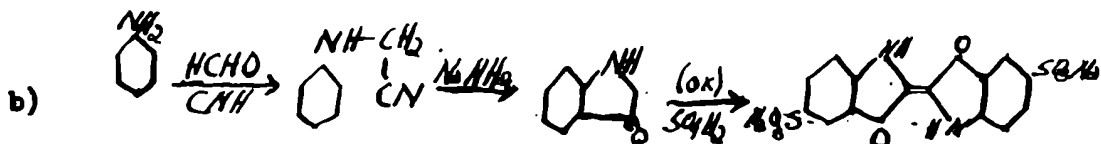
Por deshidratación de una mezcla de un mol de p-dimetilaminobenzaldehído con dos moles de N-etil-p-sulfobencil-anilina y oxidación posterior.



IX) Indigotina: Sulfo-indigotato de sodio y en sal libre.

- a) Tratando con óleum dos moles de fenilglicina se consigue: 1) la sulfonación y cierre del ciclo, y 2) la oxidación con unión de ambos ciclos.
- b) Por tratamiento del indigo con ácido sulfúrico ligeramente fumante. El indigo a su vez se obtiene a partir de la anilina, mediante la síntesis de Strecker (formaldehído y ácido cianhídrico), formándose el nitrilo de la fenilglicina que, mediante la amida sódica, en presencia de diluyentes ade-

cuados, da indoxilo que finalmente se oxida.



I) Azul Patente: Tetra-etil-di-p-amino-m-oxi-trifenilcarbinol disulfonato de calcio. (#)

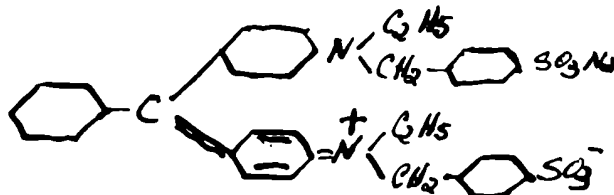
a) Por reacción de un mol de m-nitro-benzaldehido con dos moles de dietil-anilina, reducción del grupo nitro a amidegona, transformación de éste en oxihidrido mediante el ácido nitroso, sulfonación y oxidación.

b) Condensación de un mol de m-hidroxibenzaldehido con dos moles de dietil-anilina, sulfonación y oxidación.



II) Verde Guinea B: Di-p-dietil-dibencil-aminofenilcarbinol monosulfonato sódico.

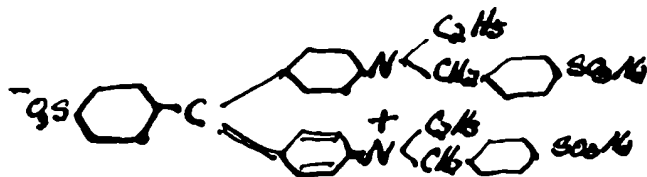
Por oxidación de la mezcla de benzaldehido y bencil-etil-anilina sulfonada.



XIII) Verde Acido J: Dietil-dibencil-di-p-aminotrifenilcarbinol trisulfonato sódico.

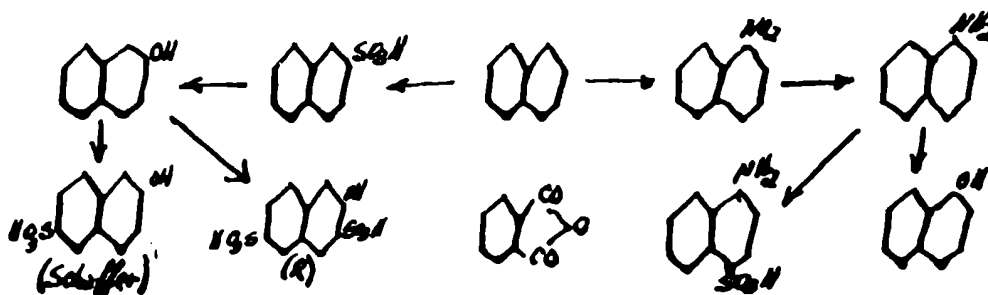
Por condensación de benzaldehido y bencil-etil-anilina, sulfonación con óleum y oxidación.

(#): El Reglamento Alimentario dice "tetra-metil", pero este compuesto no figura en el Colour Index (17). Por otra parte, Herdh (21) da a este colorante el N° 712 del C.I. que es el que corresponde al "tetra-etil".

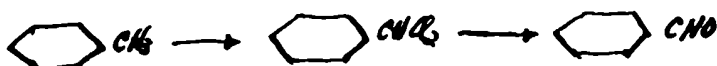


Podemos averiguar las impurezas posibles en algunos de los intermedios mencionados, estudiando su génesis:

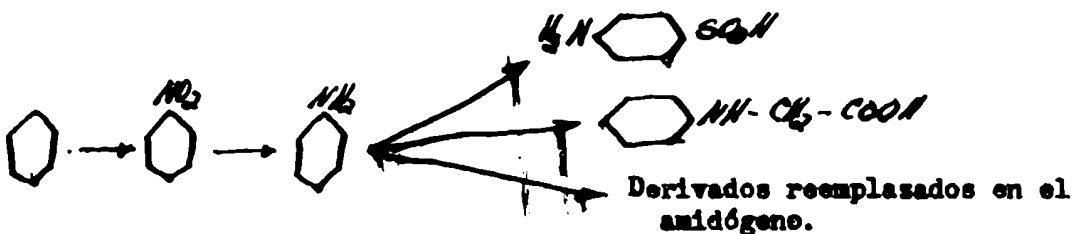
a) Derivados del naftaleno (21):



b) Derivados del tolueno (22):



c) Derivados del benceno:



Estas sustancias pueden estar presentes:

- Acido R: En el Amaranto y en el Puro 2R.
- Acido de Schaffer: En los mismos, como impureza del ácido R.
- Acido Naftiónico: En el Amaranto.
- Alfa-naftol: En el Amarillo Naftol S y en el Naranja I.
- Anhidrido ftálico: En la Eritrosina y en el Rosa Bengala.
- Acido Sulfanílico: En el Naranja I y en la Tartrazina.
- Anilina: En la Indigotina y en los derivados del trifenilmetano.
- Benzaldehído: En el Verde Guinea B y en el Verde Acido J.

Como se verá más adelante, hemos intentado utilizar algunas de estas sustancias para diferenciar colorantes certificados de industriales, según la idea expuesta más arriba.

2.- La cromatografía en la identificación de los colorantes.

La cromatografía sobre papel de filtro - que es la que hemos utilizado - tiene gran importancia en el estudio analítico de los colorantes, debido a dos propiedades principales: a) Al igual que los demás tipos de cromatografía, es capaz - mediante un uso adecuado de eluyentes y adsorbentes - de resolver mezclas que resultarían imposibles de separar por los métodos clásicos; y b) Permite determinar en una forma bastante segura la identidad de los productos estudiados.

Además de ser una técnica cómoda y económica, permite conservar los resultados y también - sin necesidad de tediosas manipulaciones - completar las determinaciones cualitativas mediante reacciones sobre el mismo papel.

Asimismo, se le han dado aplicaciones cuantitativas. La forma más rudimentaria consiste en separar por corte las distintas fracciones, disolverlas adecuadamente, y realizar una determinación colorimétrica, cosas que pueden evitarse si se dispone de un densitómetro o un reflectómetro. (24). Más interesante resulta el estudio de la relación existente entre la longitud de la mancha y la concentración de la solución empleada, que parece seguir una ley exponencial (25):

$$\text{Longitud} = (f \log \text{Conc.}) + b$$

siendo f y b constantes que dependen del cromatograma, es decir, de la técnica empleada, sistemas de solventes, etc.. Otros autores consideran no la longitud sino el tamaño de las manchas (26) o el radio, cuando son circulares (27):

$$r = f (\log \text{Conc.} + A)$$

La cromatografía sobre papel puede - principalmente - dividirse en dos tipos:

a) De adsorción, donde el solvente está constituido por agua destilada o soluciones acuosas, y el adsorbente por diversas calidades de papel de filtro, tal cual o modificado. Un antecedente de este método es el análisis capilar, que consiste en sumergir el extremo de un papel - que retiene los colorantes básicos y sustantivos - o de un hilo de lana - que retiene todos los colorantes solubles, según el pH - en la solución a estudiar; de este modo se prescinde de la elución, reemplazándola por un percolado prolongado. En el caso del agua destilada, el papel adquiere carga negativa y, por lo tanto, son fuertemente retenidos los colorantes básicos y los sustantivos. Los de sustantividad relativa forman extensas "colas" a lo largo de todo el papel, mientras que el resto de los colorantes ácidos goza de gran movilidad, es decir, su valor de R_f es cercano a la unidad. De todo esto se desprende claramente que el valor del método es escaso, tanto para realizar separaciones como para identificar colorantes. Como la mayoría de los usuales son del tipo ácido, Rutter (28) logró algunas separaciones embebiendo el papel en una solución acuosa de cetrimida al 0,03 % (bromuro de cetil-trimetil-amonio) y dejándolo secar antes de usarlo. Esto produce una inversión de la carga y, por lo tanto, de sus propiedades adsorbentes.

Entre las soluciones acuosas, debemos mencionar en primer término a las electrolíticas, es decir: ácidas, básicas y salinas, que influyen sobre la solubilidad de los colorantes debido a la variación del pH o por efecto de ion común. También se han estudiado los alcoholes en diversas concentraciones (29), polialcoholes, fenol y diversas sustancias orgánicas, tanto en mezclas simples como complejas. Pueden verse algunos ejemplos en el cuadro II.

Es de hacer notar que si los solventes mencionados se usan puros, los resultados no son satisfactorios, pues las manchas se alargan; esto se e-

vita agregando una determinada cantidad de agua. Este fenómeno se ha interpretado diciendo que se realiza una hidratación de la celulosa, lo cual nos llevaría a un sistema de partición entre las fases celulosa-agua y solvente acuoso (30). Tal vez en el caso de los colorantes, la solución sea más sencilla: son muy solubles en agua, y poco en alcoholes, etc.; por lo tanto estos solventes se saturan rápidamente y el transporte se realiza en muy pequeña escala, lo que se constata debido a que la mayor parte del soluto permanece en el lugar de partida. La adición de una cierta cantidad de agua, simplemente aumentaría la solubilidad del colorante en la mezcla, y con ello su movilidad.

b) De partición. Se efectúa con solventes inmiscibles en agua, saturados de ella y, generalmente, mezclados con un ácido, base o alcohol. La otra fase la constituye el agua (humedad) retenida por la celulosa o por los soportes utilizados en otras técnicas. No puede descartarse un proceso parcial de adsorción, debido a que el R_f depende del soporte utilizado. (31)

Esta técnica es la que da mejores resultados, tanto en cuanto a nitidez de las manchas como a poder separador. En el cuadro II damos algunos ejemplos de los valores de R_f obtenidos de esta forma. Entre ellos llamaremos la atención sobre el sistema: acetato de etilo-piridina-agua, propuesto por Jermy e Isherwood y usado con buen éxito por Moreno Calvo (32)

Recorriendo el cuadro II, podemos observar que entre la gran cantidad de valores determinados, hay algunos - los marcados con un asterisco - que se presentan en forma múltiple. Esto indica la presencia de isómeros o productos derivados de reacciones secundarias. El que ha hilado más fino al respecto - dentro de la cromatografía monodimensional, pues Graichen (33) lo ha hecho en dos dimensiones - es Moreno Calvo que, con el sistema mencionado ha logrado desdoblar gran número de colorantes, aunque ninguno de los que estamos estudiando. Este autor propone utilizar el "espectro de

manchas" de cada colorante para determinar su procedencia. Nosotros nos hemos orientado hacia la diferenciación de calidades y, utilizando este sistema de solventes, hemos conseguido algunos resultados satisfactorios que se verán más adelante.

También puede observarse que la mayoría de los sistemas de solventes propuestos presentan semejantes valores de R_f para varios de los colorantes estudiados. Con el sistema mencionado, hemos logrado separar nítidamente una mezcla de once de ellos.

En cuanto a la sensibilidad de estos métodos de identificación, depende por supuesto del límite de visibilidad de la mancha, el cual varía para cada color, y puede favorecerse mediante condiciones especiales de observación, como ser: fondos adecuados, luz ultravioleta, etc.. En general, se acepta como límite inferior de seguridad el de un milésimo de miligramo (32). Pero también existe un límite superior, que es el que corresponde a la máxima cantidad de sustancia que produce una mancha neta, apropiada para la medida, y cuyo R_f es el mismo que el del límite inferior. Depende fundamentalmente del sistema empleado, pues si el solvente llega a saturarse, no puede arrastrar todo el soluto al mismo tiempo y se forman largas colas. Ambos límites difieren en por lo menos varias decenas de microgramos. (34)

Todo lo antedicho vale para la caracterización de la sustancia problema, Pero cuando se trata de determinar calidades, lo que nos interesa, no es el valor del R_f de las manchas principales, sino el de las "parásitas" como las llama Moreno Calvo. Como las sustancias subsidiarias que las producen suelen estar en muy pequeña proporción, se hace necesario aumentar la cantidad de muestra a analizar para lograr su visualización, despreciando las deformaciones que puedan ocurrir sobre la mancha principal. El mismo criterio se debe adoptar cuando se intenta la separación de los

posibles intermediarios presentes.

En cuanto a esto último, sólo hemos encontrado dos trabajos al respecto. El primero, de Harrow y Heine (20) realizado con Amaranto y otros colorantes, se efectúa en columna, usando como eluyente una solución de sulfato de sodio al 10 %; se investigan ácido naftiónico y ácido R, midiendo su absorción en el ultravioleta. El segundo trabajo - de Hashimoto y Shimizu (35) - en realidad, trata solamente de la separación de una mezcla de ácido R y ácido G (betanaftol-6:8-disulfónico). Lo realizan en papel circular, dentro de un desecador de vacío, eluyendo con un sistema: butanol-agua-ácido acético (5:4:1). Luego copulan con ácido naftiónico diazotado - se forman: Amaranto y Rojo Cochinilla A, respectivamente - efectuando finalmente una determinación cuantitativa. No se pudieron averiguar más detalles sobre este trabajo, pues el original fué publicado en japonés.

CUADRO II

VALORES DE Rf	Amarillo Nafrol S	Sunset Yellow FCF	Tartrazina	Naranja I	Amaranto	Eritrosina	Punzó 2R	Rosa Bengala	Violeta Acido 6B	Indigotina	Azul Patente	Verde Guinea B	Verde Acido J
a (1)	0,52			0,76	0,06	1,00		1,00	0,73		0,81		0,43
(2)	0,58			0,57	0,15	0,72		0,82	0,73		1,00		0,85
b (1) HCl		0,37	0,29	0,78	0,35					0,36			
(2) NaOH		0,30	0,15			0,64							
EtOH 70%													
(7) HCl		0,71	0,88					0,30		0,46			
(9) HCl													
(10) HCl				0,63									
NaOH				0,43									
(11) HCl	0,43												
(12) HCl				0,46								0,83	
CO ₂ Na ₂												0,83	
(18) HCl			0,76							0,52		1,00	
HCl dil.													
CO ₂ Na ₂													
c	0,87		0,91	0,88									
d (1)	Dec.	Dec.	Dec.	0,93	Dec.	0,80	0,92	0,83					
(2)	0,60	0,54	0,16	0,74	0,18	0,94	0,54	0,93					
(3)	0,28	0,31	0,05	0,78	0,07	0,98	0,34	0,96					
e (1)				0,05								0,92	
(2)						0,47		0,56					
(3)	0,52						0,45						
(4)		0,60	0,38		0,48					0,52			0,78 a 1,00
f (1)	0,50		0,31	0,50	0,15		0,50			0,10#	0,20	0,50	0,01#
(2)	0,06		0,00	0,28	0,00		0,02			0,17#		0,35	0,13#
(3)	0,60		0,00	0,62	0,05		0,57			0,00	0,25	0,92	0,02
(4)	0,52		0,30	0,06	0,07		0,03			Dec.	0,96	0,85	0,56
(5)				0,80						0,10	0,00	0,97	0,95
g (1)	0,47			0,62	0,15	0,85	0,41	0,67	0,67	0,21	0,65		0,44
(2)	0,61			0,65	0,32	0,67	0,57	0,72	0,76	0,36	0,59		0,56
(3)	0,25			0,05	0,06	0,01	0,04	0,01#	0,17	0,05	0,42		Dec.
h	0,34		0,07	0,76		0,88	0,24	0,88		0,08	0,93	0,90	
i	0,75		0,36					0,93					

Dec.: Decolora

NOTAS AL CUADRO II

- a) G. Seris. (36). Con papel Durieux N° 122 o Whatman N° 2.
- 1) 100 ml. n-butanol, 10 ml. etanol y 10 ml. AcOH.
 - 2) 100 ml. n-butanol, 10 ml. etanol y 20 ml. NH₃ 20% (d:0,925)
- b) D. H. Tilden. (37). Con papel Whatman N° 1. (A continuación del número correspondiente al sistema de solventes, se indica el medio que se usó para preparar la solución del colorante).
- 1) 100 gr. fenol, 48 gr. agua y 2 gr. AcOH (atmósf. saturada de AcOH)
 - 2) 80 % de fenol y 20 % de agua.
 - 7) 95 % de n-butanol saturado con agua y 5 % de NH₃ conc.
 - 9) 97 " " " " " " " " 3 " " AcOH (atm. sat. AcOH)
 - 10) 95 " " " " " " " " 5 " " anhídrido acético.
 - 11) 200 ml. n-butanol, 2 ml. NH₃ conc., 88 ml. agua y 40 ml. etanol.
 - 12) 95 % de metanol, 2 % de agua y 3 % de ácido fórmico.
 - 18) Amoníaco saturado con alcohol amílico.
- c) A. Charro Arias (38). Usa el método circular de Rutter, con papel Albet N° 600 (español) y soluciones de colorante al 0,25 %. Desarrolla con agua saturada con isobutanol.
- d) J. R. A. Anderson y E. C. Martin (39). Usan papel Munktell's 20/150, en hojas de 20 x 30 cm.
- 1) 100 ml. etilendiamina, 5 ml. agua y 85 ml. n-butanol.
 - 2) 66 gr. fenol, 32 ml. agua y 2 ml. ácido fórmico.
 - 3) 150 gr. fenol, 48 gr. agua y 2 gr. ácido acético.
- e) Y. Ishida y col. (40).
- 1) Acido clorhídrico al 10 %.
 - 2) 1 parte de etanol al 25 % y una de amoníaco al 5 %.
 - 3) Fenol al 80 %
 - 4) 40 p. fenol, 25 p. etanol y 40 p. agua.
- f) L. Villanua y R. Wojciech. (41).
- 1) 2 p. isobutanol y 1 p. HCl N.
 - 2) " " " " " " AcOH 3N.
 - 3) Isobutanol 3N en amoníaco
 - 4) Acido clorhídrico N.
 - 5) Acido acético 12N.
- g) I. Saenz Lascano Ruiz. (42). Usa papel Arches N° 302.
- 1) 50 ml. butanol, 25 ml. etanol y 25 ml. agua.
 - 2) 100 ml. del anterior y 10 ml. amoníaco de 22°Bé.
 - 3) Solución acuosa de citrato de amonio al 3 %.
- h) I. Macció. (43). Usa papel Whatman N° 1 y 10 microgramos de colorante. Desarrolla con el sistema: 80 p. etanol, 15 p. agua y 5 p. AcOH.
- i) J. Moreno Calvo (32). Usa papel Whatman N° 1 de 40 x 41 cm. arrollado. Desarrolla durante 21 horas con: 2 p. acetato de etilo, 1 p. piridina y 2 p. agua destilada.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- Muestra de colorantes obtenidas para su estudio.

Como intentamos revelar las impurezas presentes en mayor grado en una calidad de colorantes que en la otra, se trató de reunir el mayor número posible de muestras pues, en caso de conseguirse un resultado positivo con alguna de ellas, la técnica sólo tendría valor al repetirse esta circunstancia con todos los productos similares asequibles en el comercio.

El resultado fué dispar, y se pasan a detallar las muestras obtenidas:

NOMBRE	CASA	CALIDAD	PARTIDA
<u>Amarillo Naftol S</u>			
1) Edicol Supra Yellow YS	ICI	C #	H.27313
2) Edicol Supra Yellow YS	ICI	C	H.97373
3) Amarillo Naftol SSX. esp. puro	BASF	C	-
4) Naphthol Lake Yellow FYS	ICI	I #	H.4154
5) Naphthol Lake Yellow FYS	ICI	I	H.29094
6) Amarillo Naftol S	Ciba	I	-
<u>Tartrazina</u>			
1) Edicol Supra Tartrazine NS	ICI	C	H.7780
2) Edicol Supra Tartrazine NS	ICI	C	H.30089
3) Amarillo Limón T.AF 166,7 %	Ciba	C	-
4) Tartrazine NS	ICI	I	H.3046
5) Tartrazine N 200	ICI	I	H.26046
6) Tartrazine Lake Yellow N 200	ICI	I	H.17640
<u>Naranja I</u>			
1) Anaranjado Edicol IS	Scherer	C	-

(#) C: Certificado

I: Industrial

NOMBRE	CASA	CALIDAD	PARTIDA
<u>Amaranto</u>			
1) Edicol Supra Amaranth AS	ICI	C	H.30430
2) Edicol Supra Amaranth AS	ICI	C	H.95933
3) Asorubina 2B.AF	Ciba	C	-
<u>Eritrosina</u>			
1) Edicol Supra Erythrosine AS	ICI	C	H.27629
2) Edicol Supra Erythrosine AS	ICI	C	H.96525
3) Eritrosina J. esp. pura	BASF	C	-
4) Eritrosina TB.AF Extra	Ciba	C	-
<u>Punzó 2R</u>			
1) Edicol Ponceau RS	ICI	C	H.3513
2) Edicol Supra Ponceau RS	ICI	C	H.20089
3) Edicol Supra Ponceau RS	ICI	C	H.27068
4) Naphthalene Scarlet R 125	ICI	E	H.27068
5) Naphthalene Lake Scarlet R 125	ICI	I	H.17389
6) Punzó Kitón 2R	Ciba	I	-
<u>Violeta Acido 6B</u>			
1) Violeta Acilan S4BN extra conc. (50:100)	FBy	I	-
<u>Indigotina</u>			
1) Edicol Indigo Carmine XNS	ICI	C	H.81592
2) Edicol Supra Blue XS	ICI	C	H.23398
3) Edicol Supra Blue XS	ICI	C	H.28900
4) Indigotina I esp. pura	BASF	C	-
5) Indigo Carmine X 150	ICI	I	TP.3954
6) Indigo Carmine X 200	ICI	I	TP.4341
<u>Azul Patente</u>			
1) Disulphine Blue VNS	ICI	I	H.90315
2) Disulphine Blue VN 150	ICI	I	H.28399
3) Azul Puro Kitón V	Ciba	I	-
4) Azul Patente V 180	Maxco	I	

NOMBRE	CASA	CALIDAD	PARTIDA
<u>Verde Guinea B</u>			
1) Naphthalene Green GS	ICI	I	H.88375
2) Naphthalene Green G 200	ICI	I	H.12323
3) Neran Brilliant Green G	ICI	I	E.4696
4) Neran Brilliant Green G	ICI	I	H.81264
<u>Verde Acido J</u>			
1) Edicol Green SFS	ICI	C	H.82073
2) Pencil Green SF 160	ICI	I	H.18913
3) Pencil Green SF 160	ICI	I	H.26648
4) Lissamine Green SF 150	ICI	I	H.24565
5) Lissamine Lake Green SFS	ICI	I	H.88604
6) Lissamine Lake Green SF 150	ICI	I	H.19484

Las casas proveedoras fueron:

BASF: Badische Anilin & Soda Fabrik A. G. (Unión Química S. R. L.)

Ciba: Productos Químicos Ciba S. A.

FBy: Farbenfabriken Bayer (Proindar S. R. L.)

ICI: Imperial Chemical Industries Ltd. (I.Q.A. Duparal S.A.I.C.)

Mexco S. R. L.

R. P. Scherer S.A.I.C.

Todo esto podemos resumirlo en el siguiente cuadro:

	Certificados	Industriales
Amarillo Naftol S	3 muestras	3 muestras
Tartrazina	3 "	3 "
Naranja I	1 "	- "
Amaranto	3 "	- "
Eritrosina	4 "	- "
Punzó 2R	3 "	3 "
Rosa Bengala	- "	- "
Violeta Acido 6B	- "	1 "
Indigotina	4 "	2 "
Azul Patente	- "	4 "
Verde Guinea B	- "	4 "
Verde Acido J	1 "	5 "

Como puede apreciarse, solamente se han conseguido los juegos completos de muestras correspondientes al Amarillo Naftol S, a la Tartrazina, al Fucsó 2R, a la Indigotina y al Verde Acido J, no obteniéndose ninguna del Rosa Bengala. No obstante - y a pesar de que la finalidad del trabajo solamente podría realizarse con los cinco colorantes nombrados en primer término - para la mayoría de las experiencias se ha tomado por lo menos una muestra de cada colorante y de cada calidad - 16 en total - y, en especial para los ensayos de papales y disolventes.

2.- Reacciones de reconocimiento de intermediarios, y su sensibilidad.

De los intermediarios probables mencionados en la página 12, solamente se pudieron obtener cinco, a saber: ácido R, ácido de Schaffer, ácido nafiónico, ácido sulfanílico y anilina; se ha añadido la resorcina en reemplazo del anhídrido ftálico, pues ella puede estar presente también en la Eritrosina y en el Rosa Bengala. Asimismo, se eligieron otras sustancias que - además de las anteriores - podrían servir como reactivos de reconocimiento, como ser: betanaftol, bencidina, ácido H (alfanaftol-8-amino-3:6-disulfónico) y ácido gamma (alfanaftol-7-amino-3-sulfónico).

Las reacciones han sido de copulación con diazoicos, y se han realizado todas las teóricamente posibles, buscando en el Colour Index (17) el nombre de los colorantes formados. Como esta publicación data del año 1924, algunos de estos compuestos no figuran en ella, y por lo tanto nos limitamos a consignar su color, entre paréntesis, en el cuadro de sensibilidades.

Se partió originariamente de soluciones de reactivos al 1%, excepto para el ácido sulfanílico que es poco soluble en agua destilada. Se hicieron reacciones a la gota, observándose que algunas manchas resultaban muy pálidas, por lo cual se aumentó la concentración de los reactivos correspondientes. En otro caso - el de la bencidina - se comprobó que con soluciones muy diluidas se obtienen buenos resultados, cosa que no ocurría con la utilizada al principio, debido a que el reactivo, apenas depositado sobre el papel, comenzaba a oscurecer, enmascarando a la reacción.

Después de varios ensayos, se fijó una concentración óptima del 0,02%.

Por supuesto, solamente se tomaron en cuenta aquellas reacciones que sirven verdaderamente para identificar a los intermediarios estudiados. Como se forman colores de tonos muy parecidos entre sí, resulta necesario

aplicar simultáneamente varias de ellas para lograr resultados concluyentes.

Los ensayos se realizaron sobre diversas clases de papel, no hallándose mayor diferencia entre ellos; por lo tanto se eligió el Whatman N° 1, que es el de uso más difundido en cromatografía.

Finalmente se determinaron las sensibilidades de cada una de estas reacciones, utilizando el método que se detalla a continuación.

Reactivos

Acido R: Solución al 1 %.

Acido Naftiónico: Solución al 1 %.

Clorhidrato de anilina: Solución al 4 %

Betanaftol: Solución alcalina al 1 %.

Acido H: Solución alcalina al 1 %.

Bencidina diazotada: Solución al 0,02 % en ácido acético al 0,2 %, con un exceso de nitrito de sodio sólido. Da un diazoico muy estable, pues conservado en heladera dura varios meses.

Acido sulfanílico diazotado: Solución al 0,1 % con un exceso de nitrito de sodio sólido. No necesita agregado de ácidos. El diazoico es poco estable; en heladera dura varias horas, y sobre el papel se descompone en pocos minutos.

Nitrito de sodio al 20 %.

Acido acético 0,1 N.

Como sustrato se usó papel Whatman N° 1 para cromatografía.

Aparatos

Un bastidor de madera de 15 x 40 cm. aproximadamente, sobre el cual se ha fijado una lámina de celuloide, que tiene en su centro una larga ranura de 1 cm. de ancho, y que servirá para rociar los reactivos sobre el papel. En su extremos superior tiene dos ganchos.

Uno o más marcos de madera de 25 x 40 cm. de medidas interiores, que servirán para fijar sobre ellos un cuarto de pliego de papel Whatman (de 23 x 28,5 cm.) en sentido transversal o medio pliego (23 x 57 cm.) en sentido longitudinal. En la parte superior tienen: por delante una serie de clavos que sirven para colgar el bastidor en distintas posiciones, y por detrás dos ganchos para suspenderlos de un lugar adecuado.

Nueve frascos rociadores. Se obtienen en el comercio unhas de polietileno de 25 ml. de capacidad que son muy prácticos y económicos. Inclina-dos hacia abajo sirven de goteros y, cuando están colmados, pueden lanzar un chorro continuo hacia arriba; por lo tanto su utilidad es múltiple.

Técnica

- a) Sobre un cuarto de pliego de papel - fijado en un marco - se depositan, mediante una pipeta, bandas de dilución creciente de la solución en cues-tión y se deja secar. Se gastan alrededor de 0,4 ml.
- b) Se rocían columnas - en sentido perpendicular a las bandas - de los distintos reactivos detallados más abajo y se deja secar.
- c) Se rocía todo el papel con nitrito de sodio al 20 % y, después de se-cop con ácido acético 0,1 N.

Para los reactivos previamente diasotados, es obvio que se prescinde de (c).

Los secados pueden acelerarse mediante el uso de un ventilador, y son necesarios para asegurar la buena absorción del rociado siguiente y evi-tar el escurrimiento con la consiguiente deformación de las bandas.

En algunos casos es conveniente agregar el reactivo (cuando está en so-lución alcalina) después de diasotar. Actuando de esta forma, se obtiene mayor sensibilidad al reconocer la anilina con betanaftol o con ácido H. Esto se debe - probablemente - a que reaccionan con el Amarillo de anili-na previamente formado, que es muy estable. Si se hiciese lo mismo para

reconocer al ácido sulfanílico, por ejemplo, se correría el peligro de que se destruyera el diazoto durante el secado.

Los resultados deben anotarse apenas el papel esté completamente seco tiempo suficiente para el desarrollo de todas las reacciones - pues luego los colores comienzan a cambiar.

La conservación de estas hojas presenta dificultades, pues si se guardan varias juntas, algunos de los colores formados - especialmente el Amarillo de Anilina - manchan los papeles contiguos; por lo tanto es necesario guardarlos aisladamente. En realidad, la conservación tiene un valor relativo, debido a la alteración de colores mencionada.

A continuación se detallan las reacciones consideradas, indicándose con mayúsculas los intermediarios buscados, y seguidamente los reactivos aplicados, el color resultante y su concentración límite de sensibilidad.

ACIDO R		C.L.
Bencidina.....	(Azul)	0,5 g/l
Acido sulfanílico....	(Naranja)	0,5 "
Acido naftiónico.....	Amaranto (C.I.: 184)	5,0 "
Anilina.....	Naranja Acido R (28)	5,0 "
ACIDO DE SCHAFFER		
Bencidina.....	(Violeta)	0,05 "
Acido sulfanílico....	Amarillo Crepúsculo FCF	0,05 "
Acido naftiónico.....	Rojo Sólido E (182)	5,00 "
Anilina.....	Naranja Croceína G (26)	0,50 "
ACIDO NAFTIONICO		
Diazotación.....	(Rojo)	0,5 "
Bencidina.....	Rojo Congo (370)	0,5 "
Acido R.....	Amaranto (184)	0,5 "
Betanaftol.....	Rojo Sólido A (176)	5,0 "
Acido H.....	(Azul)	5,0 "

ACIDO SULFANILICO		C.L.
Acido R.....	(Naranja)	0,3 E/1
Betanaftol.....	Naranja II (151)	0,3 "
Acido H.....	(Violeta)	0,3 "
RESORCINA		
Bencidina.....	Pardo Piramidol (380)	0,01 "
Acido Sulfanilico....	Crisóina S (148)	0,01 "
Acido Naftiónico.....	Pardo Resorcina RM (235)	0,10 "
Anilina.....	Sudán G (23)	0,05 "
ANILINA		
Diazotación.....	Amarillo de anilina (31)	5,0 "
Acido R.....	Naranja Acido R (28)	0,5 "
Betanaftol #	Sudán G (24)	1,0 "
Acido #	Azofucsina (30)	1,0 "

Los reactivos marcados con un asterisco, se han agregado luego de diazotar, consiguiéndose así un aumento de sensibilidad.

3.- Ensayo de papeles y disolventes.

De acuerdo a lo ya expuesto, el trabajo se realizó siguiendo dos caminos: a) Determinación de la calidad mediante cromatografía simple, especulando con la posible presencia de colorantes subsidiarios, y b) Separación cromatográfica de colorantes e intermediarios, y revelación de la presencia de estos últimos mediante las reacciones detalladas anteriormente.

Asimismo, se aprovechó la posibilidad de determinar algunos valores de R_f que se consideraron de interés.

Se usó la técnica ascendente-descendente propuesta por Block (44); en algunos casos - debido a la longitud del papel - se transformó en una línea en zigzag.

La cámara se preparó con una pecera de medidas: 17 x 17 x 34 cm., cubierta con dos placas de vidrio, sobre las cuales se colocó un objeto pesado (5). Se aseguró su hermeticidad con un lubricante para llaves. Mediante hilos que salían al exterior, se suspendieron - horizontalmente - dos varillas de vidrio de unos 30 cm. de longitud.

Se utilizaron cubetas de aluminio - las comunes, de congelador -. Tienen el defecto de requerir apreciable cantidad de solvente, pero son útiles cuando se desea desarrollar varios cromatogramas a la vez. Además presentan una gran superficie de evaporación.

Se ensayaron tres tipos de papeles:

El primero de ellos fué el Whatman N° 2, que pronto se abandonó por no

(5) Block recomienda cubrir con una placa entera. Sin embargo encontramos preferible nuestro sistema, por su mayor facilidad de manejo, menores riesgos de gotura y, especialmente, porque permite - sin perder la saturación del ambiente - agregar, usando un embudo adecuado, nuevas porciones de solvente, mediante la simple maniobra de separar ligeramente ambas placas.

presentar ventaja alguna sobre los demás, y ser de uso poco frecuente en cromatografía.

Papel Whatman N^o 14 de unos 90 gr. por metro cuadrado. Se usaron hojas de 23 cm. de ancho, y un largo de 28,5 o 57 cm., según los casos. Se lo utilizó para todos los sistemas de solventes, desarrollando siempre en el sentido de la máquina.

Además, para el caso del agua destilada, se usó un papel grueso especial, de unos 140 gr. por metro cuadrado, fabricado por la Imperial Chemical Industries. Sus medidas aproximadas son 27 x 37 cm. y dió muy buen resultado en algunas determinaciones.

Se prepararon dos series de soluciones: de 1 g/l para determinaciones de R_f, y saturadas o poco menos para averiguar la calidad.

También hubo variantes en la forma de depositar las muestras sobre el papel. Cuando se trataba de revelar la presencia de intermediarios, se lo realizaba en franjas a todo lo ancho de la hoja. Para ello, se hacía un doblez a unos 5 cm. de un extremo, e inclinándolo unos 60° la canaleta así formada, se hacían correes por ella - mediante una pipeta - unos 0,4 ml. de solución, recogiendo sobre un papel de filtro el eventual sobrante. Estas franjas - una vez desarrolladas - permitieron apreciar la deformación producida en ellas por los bordes del papel, la cual depende esencialmente del soluto y el sistema de solventes utilizado, y por lo general provoca un aumento o disminución del valor del R_f.

En las demás ocasiones, se procedió a trazar, con lápiz, una línea a 4 cm. del extremo inferior y, despreciando unos 4 cm. a cada costado, se fueron depositando, con intervalos de 2 cm., 2,5 microlitros de cada una de las soluciones. Esto se realizó mediante un tubito capilar especialmente calibrado al cual, para facilitar su manejo, se proveyó de un pequeño émbolo de vidrio. Una vez secas las manchas, se señaló su posición trazando su contorno a lápiz.

En cuanto a los solventes, siempre se cuidó de mantener el ambiente saturado con sus vapores. Para ello se adosaron a los costados de la cámara, tiras de papel de filtro, cuyos extremos inferiores pescaban en sendos vasitos que contenían el o los solventes en uso. En algunas ocasiones, para acelerar la saturación, se introdujeron los vasitos con solvente en ebullición, dejando enfriar un rato antes de comenzar a operar. Se reconoce fácilmente la falta de saturación debido a que el primer cromatograma acusa valores de R_f mayores que los siguientes, debido a la evaporación del solvente sobre el papel. En estos casos, se continuó trabajando hasta lograr resultados constantes. Otra forma de hacerlo es agregar sobre la parte superior del papel, una gota de solvente, la cual no debe secarse durante todo el curso de la operación.

La única mezcla de solventes utilizada fué la de Jermyrn-Isherwood ya citada, que se prepara con dos partes de acetato de etilo, una de piridina y dos de agua; se agita, se decanta y se utiliza la parte no acuosa. (29) Es el único sistema para el cual se han determinado valores exactos de R_f , debido a que los once colorantes estudiados se disponen en forma muy favorable para su separación, y además - salvo para la Eritrosina - las manchas no forman "colas" con los 2,5 microgramos empleados. Para estas determinaciones se hizo recorrer al solvente un camino medio de 15 cm. (demora unas dos horas), midiéndose luego las distancias con un comparador transparente (45), y tomando como puntos de referencia los frentes de las manchas (inicial y final). Se adoptó este criterio pues, si se consideran los centros, como hacen otros autores (29), el valor del R_f nunca puede llegar a la unidad. Como es obvio, ambos sistemas de medida dan resultados ligeramente distintos.

La temperatura ambiente osciló entre los 18 y los 30°C, no variando nunca en más de un grado centígrado en una misma determinación.

Respecto a la separación de subsidiarios, se obtuvieron buenso resul-

tados con agua destilada, soluciones salinas y la mezcla de Jermyn-Isherwood para la Indigotina, no así para el Amarillo Naftol S, la Tartrazina, el Punsó 2R y el Verde Acido J, habiéndose ensayado con el último solvente todas las muestras correspondientes (treinta) en sus soluciones concentradas.

Con el objeto de elegir el sistema de papel y solventes para determinar intermediarios, se desarrolló una mezcla conteniendo 0,5 g/l de cada uno de ellos, mediante el sistema de bandas, de acuerdo al siguiente esquema:

Acetato de etilo-piridina-agua, con papel Whatman N° 1 (A-P-H)

Sulfato de sodio al 10 %, con papel Whatman N° 1

Amoníaco 3N, con papel Whatman N° 1

Agua destilada, con papel Whatman N° 1

" " " " " " ", embebido previamente en cetrinida al 0,03 %, utilizándolo una vez seco (28)

Agua destilada, sobre papel de Imperial Chemical Industries (ICI)

Una vez que los papeles estuvieron secos, se los fijó sobre los marcos, y se aplicaron las reacciones de reconocimiento, caracterizando a los intermediarios e indicando los límites de las zonas en las cuales aparecen (considerando una o más determinaciones, según los casos), mediante una escala que va del 1 al 100, para no confundirla con la del Rf. (No se extremaron las condiciones de saturación, pues sólo se deseaban medidas comparativas aproximadas). A su vez, se determinó la posición de las manchas más intensas (capaces de enmascarar las reacciones) producidas por las soluciones concentradas de colorantes. Los resultados se detallan en el cuadro III. No se incluyen en él los valores correspondientes al papel tratado con cetrinida, que no presenta ninguna ventaja sobre el común, pues su único efecto es el de alargar las manchas de los colorantes.

Como se puede observar, no fué posible reconocer al ácido sulfanílico.

Esto tal vez se deba a una posible "dilución" de la banda durante el desarrollo, con la consiguiente disminución de su "concentración" sobre el papel, la cual quedaría por debajo de la sensibilidad.

CUADRO III

	Conc. %	Muestra Nº	A-P-H	SO ₄ Na ₂ 10 %	NH ₃ 3N	Agua desilada	
						Whatman	ICI
Acido R	0,05	-	05 - 20	50 - 60	85 - 95	85 - 90	85 - 90
Ac. de Schaffer	0,05	-	30 - 60	25 - 40	75 - 85	70 - 75	70 - 75
Ac. Naftiónico	0,05	-	20 - 50	40 - 50	70 - 75	80 - 85	75 - 85
Ac. Sulfanilico	0,05	-	---	---	---	---	---
Resorcina	0,05	-	90 - 95	95 - 100	40 - 45	60 - 70	60 - 70
Anilina	0,05	-	10 - 20	60 - 75	85 - 90	90 - 95	---
Amarillo Naftol S	10	2;5	25 - 45	05 - 45	45 - 80	60 - 90	60 - 90
Tartrazina	14	2;5	00 - 05	00 - 45	65 - 90	60 - 90	75 - 90
Naranja I	5	1	45 - 65	00 - 05	15 - 55	30 - 90	00 - 80
Amaranto	14	2	00 - 05 15 - 20	00 - 30	15 - 85	60 - 95	70 - 85
Eritrosina	14	2	10 - 70	00 - 15	00 - 80	30 - 90	00 - 80
Punzó 2R	9	3;4	05 - 20	00 - 10	00 - 85	50 - 80	80 - 90
Violeta Acido 6B	Sat.	1	00 - 65	00 - 10	00 - 95	80 - 100	65 - 90
Indigotina	1	2;6	00 - 10	00 - 15	15 - 65	70 - 90	70 - 95
Azul Patente	Sat.	2	10 - 20	35 - 75	70 - 95	60 - 100	60 - 100
Verde Guinea B	Sat.	4	10 - 80	00 - 75	45 - 90	05 - 100	05 - 100
Verde Acido J	25	1;2	00 - 40	25 - 90	75 - 100	50 - 100	40 - 100

4.- Aplicación de la técnica adoptada en base a los ensayos previos.

Estudiando el cuadro III, y tomando en cuenta los intermediarios que pueden estar presentes en cada colorantes, que son:

- En Tartrazina: Acido Sulfanilico
- " Naranja I: Acido Sulfanilico
- " Amaranto: Acido R, ácido de Schaffer y ácido naftiónico
- " Eritrosina: Resorcina
- " Punsó 2R: Acido R y ácido de Schaffer
- " Violeta Acido 6B: Anilina
- " Indigotina: "
- " Azul Patente: "
- " Verde Guinea B: 4#
- " Verde Acido J: "

podamos confeccionar el cuadro IV, en el cual se indica la posición de los intermediarios que pueden caracterizarse sin interferencias en cada colorante, y los solventes que deben usarse para ello.

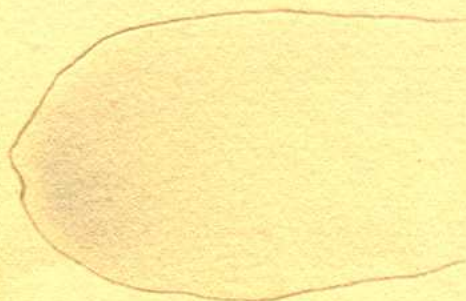
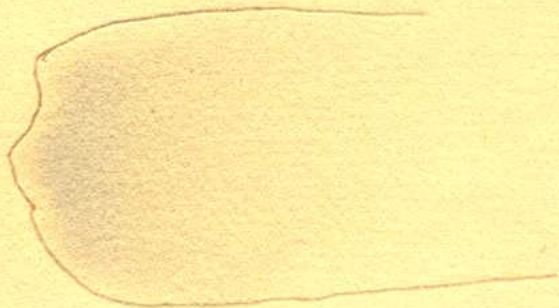
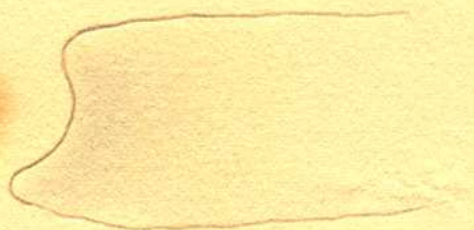
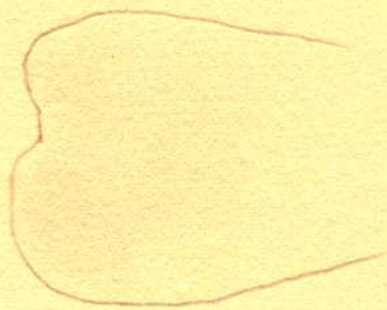
A pesar de que solamente conseguimos los juegos completos de muestras de dos de los cinco colorantes incluidos en este cuadro, decidimos estudiar a los demás para formarnos una idea acerca de su pureza.

Como siempre, el desarrollo se efectuó por el sistema de bandas, haciendo recorrer al solvente una distancia media de 30 cm., y aplicando luego las reacciones indicadas para cada caso.

Además - como precaución - por si estuviera presente algún intermedio no estudiado - se desarrollaron con agua - sobre papel de ICI - todos los once colorantes, aplicándoseles luego los siete reactivos ya mencionados.

CUADRO IV

Colorante y solvente	POSICION					
	Colo- rante	Acido R	Ac. de Schaff.	Acido Naftion	Resor- cina	Anilina
AMARANTO						
A-P-H	{ 00 - 05 15 - 20	05 - 20	30 - 60	20 - 50	---	---
SO ₄ Na ₂ 10 %	00 - 30	50 - 60	25 - 40	40 - 50	---	---
NH ₃ 3N	15 - 85	85 - 95	---	---	---	---
Agua (ICI)	70 - 85	85 - 90	---	---	---	---
ERITROSINA						
A-P-H	10 - 70	---	---	---	90 - 95	---
SO ₄ Na ₂ 10 %	00 - 15	---	---	---	95 - 100	---
PUNZO 2R						
A-P-H	05 - 20	---	30 - 60	---	---	---
SO ₄ Na ₂ 10 %	00 - 10	50 - 60	25 - 40	---	---	---
NH ₃ 3N	00 - 85	85 - 95	---	---	---	---
Agua (Whatman)	50 - 80	85 - 90	---	---	---	---
Agua (ICI)	80 - 90	---	70 - 75	---	---	---
VIOLETA ACIDO 6B						
SO ₄ Na ₂ 10 %	00 - 10	---	---	---	---	60 - 75
INDIGOTINA						
A-P-H	00 - 10	---	---	---	---	10 - 20
SO ₄ Na ₂ 10 %	00 - 15	---	---	---	---	60 - 75
NH ₃ 3N	15 - 65	---	---	---	---	85 - 90
Agua (Whatman)	70 & 90	---	---	---	---	90 - 95





1 2 3 4 5 6

5.- Resultados, discusión y conclusiones.

La diferenciación de colorantes certificados e industriales mediante la investigación de subsidiarios, solamente dió resultados para la Indigotina. Con los solventes acuosos, las muestras industriales dan, además de la mancha normal, una o dos manchas azules adicionales, de mayor Rf. Sobre papel Whatman N° 1, la separación es mayor con amoníaco, siendo la menor la obtenida con la solución de sulfato de sodio al 10 %, pero todas ellas tienen el defecto de producir largas colas, con la consiguiente "dilución" del color sobre el papel. Mejores resultados se han logrado usando como adsorbente el papel de ICI, y depositando las soluciones de muestras en forma de pequeñas franjas, en vez de los círculos habituales. Así se obtuvieron separaciones nítidas y fácilmente visibles, que se aprecian en el cromatograma adjunto, donde los números corresponden a las muestras de la página 21.

La mezcla de acetato de etilo-piridina-agua, ha resultado ser la más eficaz en este sentido. Se distingue de los demás solventes en que produce dos manchas normales, teniendo la tercera - adicional - un Rf menor. Todas ellas son nítidas y no presentan colas. Damos como dato ilustrativo, los valores de Rf obtenidos con este solvente, sobre papel Whatman N° 1, para las seis muestras de Indigotina, en soluciones al 1 % en agua destilada:

CUADRO V

Muestra N°	Calidad	Rf e intensidad		
		Mayor	Media	Menor
1	Certificado	0,05	-	0,10
2	"	0,06	-	0,10
3	"	0,06	-	0,10
4	"	0,06	-	0,10
5	Industrial	0,05	0,02	0,11
6	"	0,06	0,02	0,10

Es de hacer notar que la cantidad de 25 microgramos de colorante, utilizada, está por encima del límite superior de identificación, pues la solución de 1 g/l (correspondiente a 2,5 microgramos) da valores de Rf ligeramente mejores, como se verá más adelante.

Respecto a la búsqueda de intermediarios, se obtuvieron resultados positivos con el Amaranto, los cuales se indican en el cuadro siguiente (marcados con un asterisco).

CUADRO VI

Solvente	Acido R	Acido de Schaffer	Acido Naftiónico
A-P-H	#	#	#
SO ₄ Na ₂ 10 %	#	-	#
NH ₃ 3N	#		
Agua (ICI)	-		

Hubo dos resultados negativos que pueden explicarse observando el cuadro IV. En él vemos que, en ambos casos, las posiciones del colorante y los intermediarios son muy próximas (00 - 30 y 25 - 40; 70 - 85 y 85 - 90) y es muy posible una superposición de bandas debido a que el Rf de las soluciones concentradas no es constante.

Los colores formados han sido siempre muy débiles, lo cual indica que la concentración de estos intermediarios es cercana al límite de identificación. Como trabajamos con una solución de Amaranto al 14 %, podemos calcular que - aproximadamente - el contenido en intermediarios de este colorante certificado es:

- 0,350 % de ácido R
- 0,350 " " " naftiónico
- 0,035 " " " de Schaffer

Además, también aparecieron manchas al estudiar los cromatogramas del Fanzó 2R desarrollados con sulfato de sodio al 10 %:

CUADRO VII

Muestra N ^o	Residuo de la solución al 9%	Calidad	Acido R	Acido de Schaffer	Observaciones
1	Abundante	Certificado	#	#	
2	Nulo	"			Dudoso
3	Nulo	"			"
4	Escaso	Industrial	#	#	
5	Abundante	"	#	##	
6	Escaso	"	#	#	

Las muestras N^o 2 y 3 dieron resultado dudoso por la siguiente razón: Son formas perfeccionadas en lo que atañe a la solubilidad (no hay que olvidar que el Punsó 2R proviene de una mezcla de isómeros de la xilidina) pero, una vez depositadas sobre el papel - en solución concentrada - y secadas, obstruyen por completo los capilares de tal manera que, si se trabaja por el sistema de bandas, se produce una virtual detención de la columna líquida. Si el depósito se realiza en forma de manchas aisladas, el solvente pasa por los intervalos entre ellas, las rodea y continúa su marcha sin producir mayor arrastre. Este inconveniente se logra subsanar - en parte - humedeciendo las manchas antes de comenzar a operar, lo cual provoca un principio de solubilización con la consiguiente formación de canales que facilitan la marcha del solvente; pero siempre subsiste cierta retención que falsea las posiciones de las manchas. Como el ácido R y el ácido de Schaffer dan - a grandes diluciones - colores muy parecidos con los reactivos de reconocimiento, solamente se los diferencia por su posición relativa, cuando coexisten. Cuando aparece uno solo de ellos, debido a lo ya expresado, su identificación es incierta.

No puede descartarse tampoco la posibilidad de que las manchas sean producidas por intermediarios no estudiados.

En cuanto al problema que dió origen a este trabajo, no puede ser resuelto de esta forma, debido a que los colores formados son todos de i-

gual intensidad.

Se midieron también los valores de Rf de los once colorantes estudiados, en solución de 1 g/l (2,5 microgramos), desarrollados con la mezcla acetato de etilo-piridina-agua, sobre papel Whatman N° 1, y cuyos promedios se consignan en el cuadro siguiente, por orden ascendente de movilidad, habiéndose tomado como puntos de referencia los frentes de las manchas.

CUADRO VIII

Colorante	Rf (1 g/l)	Posición (Sol. conc.)
Tartrazina	0,02	00 - 05
Amaranto	0,02	{ 00 - 05 15 - 20
Indigotina	{ 0,04 0,08	00 - 10
Verde Acido J	0,07	00 - 40
Pansó 2R	0,15	05 - 20
Azul Patente	0,20	10 - 20
Violeta Acido 6B	0,25	00 - 65
Verde Guinea B	0,28	10 - 80
Amarillo Naftol S	0,37	25 - 45
Naranja I	0,52	45 - 65
Eritrosina	0,56	100- 70

Los valores de la posición están tomados del cuadro III.

Como puede observarse, los frentes de las manchas de las soluciones concentradas tienen - por lo general - valores superiores a los de las diluidas. Asimismo, presentan largas colas que abarcan varias decenas de unidades convencionales.

Como en la mayoría de las mezclas comerciales, uno o dos colorantes predominan notablemente sobre los demás, se hace necesario estudiarlas en soluciones medianamente concentradas, para poder apreciar todos sus

componentes. (límite de visibilidad). Esto presupone una seria complicación, debido a las posibles superposiciones de manchas con las consiguientes interferencias.

Hemos estudiado el problema, desarrollando una mezcla ligeramente concentrada de los once colorantes en cantidades dispares, y observamos que solamente existe incertidumbre en los casos en que uno de los colorantes superpuestos es secundario. Ello ocurre principalmente con los sistemas:

- 1) Indigotina - Verde Acido J.
- 2) Azul Patente - Violeta Acido 6B - Verde Guinea B - Amarillo Naftol S.
- 3) Naranja I - Eritrosina.

Los dos primeros casos se resuelven fácilmente, pues es sabido que ambos verdes y el Azul Patente pierden su color cuando son desarrollados mediante un solvente alcalino - como el que estamos tratando - y lo recuperan una vez que el papel se ha secado (41). Todo se reduce pues, a marcar el contorno de las demás manchas sobre el cromatograma húmedo.

Comparando nuestros valores de Rf con los obtenidos por Moreno Calvo (cuadro II, serie 1. Amarillo Naftol S: 0,75; Tartrazina: 0,36), vemos que estos últimos son mucho mayores. Ello puede deberse a diferencias de técnica: este autor desarrolla - con el mismo solvente - durante 21 horas sobre papel Whatman N° 1 arrollado, de 40 x 41 cm. Nosotros, con nuestro sistema en zigzag - de unos 15 cm. por sección, a partir de la muestra - hemos logrado en 11 horas una columna emergente de 37 cm. Si bien la fuerza de gravedad podría tener alguna influencia en el tiempo de ascensión, la gran diferencia entre ambos casos (10 horas) y los altos valores de Rf obtenidos, nos hacen pensar en una falta de saturación del ambiente.

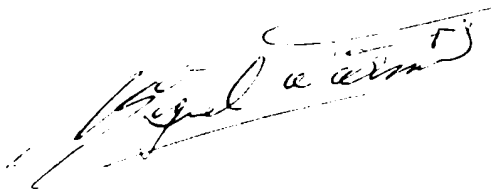
De todo esto, podemos deducir que los valores de Rf que se publican tan profusamente, sólo tienen interés real para su autor, siendo su valor muy relativo para los lectores, debido a las dificultades que presenta la

reproducción exacta de la técnica, la temperatura, el grado de saturación del ambiente, etc.. En consecuencia, estos datos deben tomarse simplemente como comparativos, y servirse de patrones para la identificación.

Como corolario de estos razonamientos, surge la necesidad de organización, que llegará con el tiempo, cuando se adopte una técnica de uso universal, con pocas variables, a la cual podría llegarse - tal vez - mediante el uso de sistemas de solventes de muy baja tensión de vapor, que eliminarían el importante problema de la saturación del ambiente.

Conclusiones.

- 1) Es factible la determinación cromatográfica de la calidad de una muestra de Indigotina (de las estudiadas), debido a que las industriales siempre dan mayor número de manchas que las certificadas. Los mejores resultados se obtienen con la mezcla de Jermy-Isherwood. También resulta eficaz - para los solventes acuosos - el uso de un sustrato grueso como el papel de ICI.
- 2) Si bien no pudo efectuarse diferenciación alguna mediante la búsqueda de intermediarios, ha quedado demostrada la eficacia de la técnica al hallarse varios de ellos en el Amaranto y en el Punsó 2R.
- 3) Mediante la mezcla acetato de etilo-piridina-agua, es posible la diferenciación completa de una mezcla de los once colorantes estudiados, siempre que la cantidad de Eritrosina no sea mucho mayor que la de Naranja I.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Truhaut, R., Ann. Pharm. Fran. XIII, 36-51, 87-111 (1955). Sur l'action cancérigène de certains matières colorants. Importance en hygiène alimentaire, en thérapeutique et en hygiène générale.
- 2) Reunión Internacional para el estudio de la profilaxis del cáncer y en especial del problema de los colorantes usados en la alimentación., An. Brom. (Madrid) VI, 285-92 (1954).
- 3) Conferencia de aditivos para alimentos. Ginebra. 19/IX/1955. Además la OMS publicó: WHO/Food Add/1 (cont), 1/XII/56, y Fichas informativas sobre los colorantes alimentarios, WHO/Food Add/1 Corr. 1 8/II/1957.
- 4) Souverain, R., Ann. Fals. Fraud. 50, 338-371 (1957) Travaux des Organisations internationales sur l'hygiène alimentaire depuis 1950.
- 5) Reglamento Alimentario de la República Argentina. Buenos Aires. 1953.
- 6) Colour Index. The Society of Dyers and Colourists (Gran Bretaña) and the American Association of Textile Chemists and Colorists. Segunda edición. 4 tomos. Bradford (G.B.) y Lowell (EEUU). 1956
- 7) Fiches de renseignements sur les colorants pouvant être ajoutés aux aliments. Sous-Comité d'experts chargé du Contrôle sanitaire des Denrées alimentaires. Union de l'Europe Occidentale. Avril 1956.
- 8) Ministry of Food. Food Standards Committee Report on Colouring Matters. Recommendations relating to the use of colouring matters in foods. London HMSO. 1954
- 9) Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Food Standards Committee Supplementary Report on Colouring Matters. Recommendations relating to the use of colouring matters in foods. London. HMSO. 1955
- 10) Deutsche Forschungsgemeinschaft, Fachkommission zur Bearbeitung des Lebensmittel-Farbstoffproblems. Mitteilung 6: Zusammengestellt im Auftrage der Kommission von Priv. Doz. Dr. G. Hecht, Wuppertal-Elberfeld (1/XII/55) Consultado en el Colour Index. I, 1803 (1956)

- 11) U.S. Federal Security Agency, Food and Drug Administration, Service and Regulatory Announcement: Food, Drug and Cosmetic Nº 3. Coal-tar Color Regulations. September 1940. Consultado en el Colour Index, I. 1800 (1944)
- 12) U.S. Federal Food, Drug and Cosmetic Act and General Regulations for its Enforcement, Service and Regulatory Announcement. F. D. & C Nº 1. Revision 4. April 1955. Consultado en el Colour Index. I, 1800 (1956)
- 13) Federal Register, IX, 8492-95 (16/XI/1955). Consultado en el Chem. Abs. 50, 1222h (1956)
- 14) Green, A. G., A Systematic Survey of the Organic Colouring Matters. London y N. York. 1904
- 15) Mulliken, ., A Method for the identification of Pure Organic Compounds. Volumen 3. N/ York. 1910
- 16) Schultz, G., Farbstofftabellen. Berlin. 1911/14
- 17) Rowe, F. M., Colour Index. The Society of Dyers and Colourists. Primera edición. Bradford (G.B.) 1924
- 18) Schultz, G., Farbstofftabellen. Tomo I, Leipzig. 1931
- 19) Imperial Chemical Industries Ltd. Colorantes Edicol Supra para comestibles. Manchester. 1953. pág: 17.
- 20) Harrow, L. S., y Heine, K. S., J. of the A.O.A.C. 36, 936-43 (1953). The separation and determination of sulphonated naphthalene intermediates in certified coal-tar colors.
- 21) Hordh, U., Las materias colorantes en los productos alimenticios. Buenos Aires, 1941. pág: 172
- 22) Imperial Chemical Industries Ltd. Intermediates manufactures from Naphthalene. Cuadro Mural.
- 23) Imperial Chemical Industries Ltd. Intermediates from Toluene. C. Mural.
- 24) Yamaguchi, K. y col., J. Pharm. Soc. Japan 74, 1322-6 (1954). Aplicación analítica de la determinación de la reflectancia. I: Determinación sobre papel de filtro de la espectro-reflectancia de colorantes sintéticos para alimentos. (En japonés). Consultado en el Chem. Abs. 49, 4441a (1955)

- 25) Moreno Calvo, J., An. Brom. (Madrid). VII, 95-105 (1955) Cromatografía de glúcidos sobre papel. I.- Resultados con el sistema acetato de etilopiridina-agua.
- 26) Cramer, F., Cromatografía sobre papel. Buenos Aires 1958. pág: 50
- 27) Villar Palasí, V., Cromatografía sobre papel. Consejo Superior de Investigaciones científicas. Madrid. 1952. pág: 25
- 28) Rutter, L., Nature 166, 273 (1950). Treatment of Paper for Chromatography of Some Colloidal Electrolytes.
- 29) Valenciano, O. A. e Ibarra, A. I., R. As. Bioq. Argentina. XI, 145-55, 292-99 (1955). Cromatografía sobre papel de los colorantes permitidos por el Reglamento Alimentario.
- 30) Cramer, F., Obra citada. pág: 25-27
- 31) id. id. pág: 23-24
- 32) Moreno Calvo, J., An. Brom. (Madrid). IX, 423-46 (1957) Papiro cromatografía de colorantes orgánicos permitidos y no permitidos en alimentos.
- 33) Graichen, Ch., J. of the A.O.A.C., 34, 795-99 (1955). Paper chromatography of fluorescein and the halogenated fluoresceins.
- 34) Cramer, F., Obra citada. pág: 30
- 35) Hashimoto, Y. y Shimizu, S., J. Pharm. Soc. Japan. 73 767-9 (1953). Separación mediante cromatografía sobre papel de productos intermedios de colorantes alimentarios (En japonés). Consultado en el Chem. Abs. 47, 10141c (1953)
- 36) Seris, G., Ann. Fals. Fraud. 49, 110-14 (1952). La chromatographie sur papier, moyen d'identification des colorants utilisées dans les denrées alimentaires.
- 37) Tilden, D. H., J. of the A.O.A.C. 35, 423-35 (1952); 36, 802-12 (1953) Report on paper chromatography of coal-tar colors.
- 38) Charro Arias, A., An. Brom. (Madrid). V, 359-73 (1953). Cromatografía-papel de los colorantes sintéticos de interés bromatológico.

- 39) Anderson, J. R. A. y Martin, E. C., *Analyt. Chim. Acta.* 8, 530-37 (1953). The chromatographic examination of permissible food dyes.
- 40) Ishida, Y, y col., *J. Pharm. Soc. Japan.* 73, 736-40 (1953). Identificación sistemática, mediante cromatografía sobre papel, de los colorantes alimentarios hidrosolubles permitidos en Japón. (En japonés). Consultado en el *Chem. Abs.* 47, 10141d,e (1953)
- 41) Villanua, L. y Wojciech, R., *An. Brom. (Madrid)* VI, 473-557 (1954). El problema de la coloración artificial de los alimentos, y métodos analíticos para su investigación.
- 42) Saenz-Lascano-Ruiz, I., *Ann. Fals. Fraud.* 49, 315-32 (1956). Extraction et identification des colorants synthétiques incorporés aux aliments.
- 43) Macció, I., *An. Direc. Nac. de Quim.* N° 17, 10-12 (1956). Estudio cromatográfico de nueve colorantes derivados del alquitrán de hulla admitidos por el Reglamento Alimentario para uso alimenticio.
- 44) Block, R. J., LeStrange, R. y Zweig, G., *Paper Chromatography. A Laboratory Manual.* N. York. 1952. pág: 21
- 45) Cramer, F., *Obra citada.* pag: 47

COPIA
INDICE

	pág.
<u>Antecedentes bibliograficos</u>	4
Los colorantes de síntesis en los alimentos: aspecto higiénico y legal	5
Colorantes admitidos	6
Colorantes con certificado e industriales... ..	7
Intermediarios de síntesis	7
La cromatografía en la identificación de los colorantes	14
<u>Parte experimental</u>	19
Muestras de colorantes obtenidas para su estudio	20
Reacciones de reconocimiento de intermediarios, y su sensibilidad... ..	24
Ensayo de papeles y disolventes	29
Aplicación de la técnica adoptada en base a los ensayos previos	34
Resultados y discusión	36
Conclusiones	41
<u>Bibliografía</u>	42
CUADRO I: Listas de colorantes recomendados o admitidos	6 a
CUADRO II: Valores de Rf de los colorantes estudiados, publicados por diversos autores	18 a
CUADRO III: Posición - con diversos solventes - de las manchas producidas por los intermediarios y los colorantes estudiados	33
CUADRO IV: Intermediarios cuya presencia puede ser revelada sin interferencias	35
CUADRO V: Determinación de la calidad de las muestras de Indigotina, en base a la separación de colorantes subsidiarios	36
CUADRO VI: Identificación de intermediarios en el Amaranto	37
CUADRO VII: Identificación de intermediarios en el Puzó 2R... ..	38
CUADRO VIII: Valores de Rf de los once colorantes estudiados, para el sistema acetato de etilo-piridina-agua... ..	39