

Instituto Politécnico Nacional

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA**

UNIDAD QUERÉTARO

POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**Evaluación de los Factores Responsables de
la Decoloración del Licor de Almendras
Denominado Tipo “Amaretto”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

M.E.S. Felipe Castañeda Olivares

Directores de Tesis:

Dra. Eva González Jasso

Dr. Reynaldo Carlos Pless Elling



Querétaro, Qro. Noviembre de 2011



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

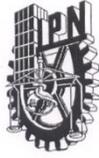
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Querétaro, Qro. el día 5 del mes Abril del año 2011, el (la) que suscribe Felipe Castañeda Olivares alumno (a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada con número de registro B061674, adscrito a CICATA, QUERÉTARO, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Eva González Jasso y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación de los Factores Responsables de la Decoloración del Licor de Almendras denominado Tipo "Amaretto", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección fcastanedao@utsjr.edu.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MES. Felipe Castañeda Olivares

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Querétaro, Qro siendo las 14 horas del día 6 del mes de Abril del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA, QRO para examinar la tesis titulada:
Evaluación de los Factores Responsables de la Decoloración del Licor de Almendras denominado Tipo "Amaretto"

Presentada por el alumno:

Castañeda
Apellido paterno

Olivares
Apellido materno

Felipe
Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	6	7	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctor en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Eva González Jasso

Dr. Reynaldo Pless Elling

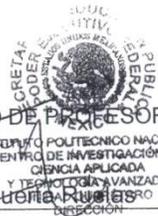
Dr. Jorge Adalberto Huerta Ruelas

Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde

Dr. Carlos Martín Cortés Romero

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jorge Adalberto Huerta Ruelas



AGRADECIMIENTOS

Cuando se concluye un ciclo de la vida, siempre es bueno voltear atrás y agradecer a las personas que nos acompañaron en dicho ciclo, pues uno no podría andar solo por el mundo aprendiendo por sí mismo, todos y cada uno de ustedes fueron partícipes de mis logros y fracasos, pero ahí estuvieron para darme la fuerza para seguir.

Agradezco a mi esposa y a mi hija por su paciencia, por estos años donde no dejaron de soñar y apoyarme.

Agradezco a mis asesores Dra. Eva González Jasso y Dr. Reynaldo Pless Elling, con quienes tuve la fortuna de contar y compartir todo este proceso desde un principio.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Jorge A. Huerta Ruelas y Dr. Pedro Vázquez Landaverde, quienes siempre apoyaron y orientaron el proceso.

Al Dr. Carlos Martín Cortés y a su esposa la Dra Angy, pues fueron importantes en éste último impulso.

A mi padre y madre, quienes en su amor incondicional, forjaron lo que ahora soy. Espero que estén orgullosos de las semillas que alguna vez sembraron.

Gracias Lina por hacer la travesía más llevadera.

Agradezco a Dios por permitirme poder llevar a cabo la aventura de vivir.

Mi infinito agradecimiento a todos ustedes y a los compañeros de camino que siempre estuvieron ahí.

¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS ADICIONALES

Agradezco al personal del Departamento de Posgrado del CICATA-IPN Querétaro por el apoyo brindado a lo largo de este trabajo de Doctorado.

El equipo de HPLC utilizado en esta investigación fue adquirido con fondos del proyecto de Ciencia Básica CONACYT 61322.

También agradezco al cuerpo directivo de la Universidad Tecnológica de San Juan del Río las facilidades otorgadas para la conclusión de este trabajo, especialmente al Dr. Alejandro Saracho Luna y al M. en C. Jaime Hernández Rivera.

DEDICATORIA

*Con todo mi amor, respeto y admiración, para ustedes
que son mi fuente de inspiración y en quien pienso
siempre para hacer lo necesario:*

Lety y Erika Citlalli.

*Los ideales son como las estrellas:
nunca las podemos tocar con las manos,
pero al igual que los marinos en alta mar,
las tenemos como nuestra guía y, siguiéndolas,
llegamos a nuestro destino.*

Carl Schurz

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	9
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	10
Antecedentes	10
2.1. Licores.....	10
2.2. Color.....	11
2.2.1. Colorantes.....	12
2.2.1.1. Los colorantes azoicos	12
a) Allura Red (Rojo 40).....	13
b) Tartrazina (Amarillo 5)	14
2.2.1.2. Reacciones de colorantes azoicos.....	15
Oxidación de los compuestos arilazoicos.....	18
Reducción de los compuestos arilazoicos	22
Otras reacciones de los azoarenos	26
Reacciones biológicas	27
2.3. Edulcorantes.....	29
2.4. Fotoquímica.....	35
2.5 Química Computacional.....	36
Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN.....	39
Capítulo 4. HIPÓTESIS	40
Capítulo 5. OBJETIVOS.....	41
5.1. Objetivo General	41
5.2. Objetivos Específicos.....	41
Capítulo 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
6.1 Materiales.....	42
6.1.1. Equipo	42

6.1.2. Materia prima	42
6.1.3. Reactivos	43
6.2. Métodos.....	43
6.2.1. Físicoquímicos	43
6.2.1.1. Determinación del porcentaje de alcohol en volumen a 20°C	43
6.2.1.2. Medición de pH.....	44
6.2.1.3. Medición de °Brix e índice de refracción.....	44
6.2.2. Cromatografía en capa fina	44
6.2.2.1. Edulcorantes	44
6.2.2.2. Colorantes.....	45
6.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	45
6.2.3.1. Edulcorantes	45
6.2.3.2. Colorantes.....	45
6.2.4. Cinética de decoloración	46
6.2.5. Química Computacional.....	47
Capítulo 7. RESULTADOS	50
7.1. Caracterización físicoquímica de diferentes marcas de licor tipo Amaretto	50
7.2. Caracterización de colorantes contenidos en los diferentes licores.....	50
7.2.1 Caracterización de colorantes por cromatografía en capa fina.....	50
7.2.2 Caracterización de colorantes por espectrofotometría UV-Visible	52
7.2.3 Caracterización de colorantes por HPLC	55
7.3. Caracterización de edulcorantes contenidos en los diferentes licores	56
7.3.1 Edulcorantes por cromatografía en capa fina de sílice	56
7.3.2 Edulcorantes por HPLC	58
7.4. Cinética de decoloración	62
Capítulo 8. DISCUSIÓN.....	93
Capítulo 9. CONCLUSIONES.....	102
Capítulo 10. REFERENCIAS	104
PRODUCTOS DE LA TESIS.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Relación entre las longitudes de onda y los colores percibidos	11
Tabla 2: Longitudes de onda de máxima absorción de colorantes azoicos	17
Tabla 3: Costos promedio de producción de edulcorantes expresados en dólares de EE.UU. por tonelada equivalente de dulzor de edulcorante, para el 2000	30
Tabla 4: Caracterización fisicoquímica de 3 marcas de licor tipo Amaretto	50
Tabla 5: Valores de absorbancia (a 428 nm y 502 nm) de los espectros de la Figura 21	63
Tabla 6: Resumen de parámetros cinéticos para A_{428}	74
Tabla 7: Resumen de parámetros cinéticos para A_{502}	75
Tabla 8. Resultados termodinámicos de la reacción de Tartrazina con Fructosa	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula general de los colorantes azoicos	13
Figura 2: Allura Red.....	14
Figura 3: Tartrazina.....	15
Figura 4: Principales mecanismos biológicos y químicos en la reducción de colorantes azoicos a aminos aromáticas	23
Figura 5: Reacciones de adición al grupo carbonilo	31
Figura 6: Formación de ácidos aldónicos de glucosa.....	33
Figura 7: Formación de ácidos aldónicos de fructosa	34
Figura 8: Reacción de Fehling	34
Figura 9: Reacción de Tollens.....	35
Figura 10: Cámara de irradiación.....	47
Figura 11: Extracción líquido-líquido con 1-propanol:agua. De izquierda a derecha: Tartrazina, Allura Red y color caramelo.	51
Figura 12: Espectros de absorción de diferentes colorantes.....	52
Figura 13: Espectros de absorción de diferentes marcas de licores	53
Figura 14: Línea base, agua vs agua.....	54
Figura 15: Línea base, etanol-agua (28%, v/v) vs agua.....	54
Figura 16: Perfil cromatográfico en HPLC del estándar de Tartrazina.....	55
Figura 17: Perfil cromatográfico en HPLC del estándar de Allura Red.....	55
Figura 18: Perfiles cromatográficos en HPLC de edulcorantes en marcas A, B y C de Amarettos..	59
Figura 19: Perfiles cromatográficos en HPLC de estándares de sacarosa.....	60
Figura 20: Perfiles cromatográficos en HPLC de estándares de Fructosa 42	61
Figura 21: Evolución de los espectros de absorción de formulaciones alternativas de Amaretto en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente	62
Figura 22: Evolución de los espectros de absorción de diferentes marcas de licor irradiadas a 841 W/m ²	63
Figura 23: Evolución de los espectros de absorción de la formulación con Fructosa 42 irradiada a 841 W/m ²	64
Figura 24: Evolución de espectros de absorción de la formulación preparada con sacarosa e irradiada a 841 W/m ²	65
Figura 25: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada sin edulcorante e irradiada a 841 W/m ²	65

Figura 26: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con Fructosa 42 e irradiada a 652 W/m ²	66
Figura 27: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con sacarosa e irradiada a 652 W/m ²	66
Figura 28: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada sin edulcorante e irradiada a 652 W/m ²	67
Figura 29: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con Fructosa 42 e irradiada a 290 W/m ²	67
Figura 30: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con sacarosa e irradiada a 290 W/m ²	68
Figura 31: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada sin edulcorante e irradiada a 290 W/m ²	68
Figura 32: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 428 nm. Formulación con Fructosa 42 irradiada a 290 W/m ²	69
Figura 33: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 428 nm. Formulación con sacarosa irradiada a 652 W/m ²	70
Figura 34: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 428 nm. Formulación sin edulcorante irradiada a 290 W/m ²	70
Figura 35: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 502 nm. Formulación con Fructosa 42 irradiada a 290 W/m ²	71
Figura 36: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 502 nm. Formulación con sacarosa irradiada a 841 W/m ²	71
Figura 37: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 502 nm. Formulación sin edulcorante irradiada a 290 W/m ²	72
Figura 38: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/fructosa irradiada a 652 W/m ²	78
Figura 39: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/glucosa irradiada a 652 W/m ²	78
Figura 40: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/sacarosa irradiada a 652 W/m ²	79
Figura 41: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/sin edulcorante irradiada a 652 W/m ²	79
Figura 42: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/fructosa irradiada a 652 W/m ²	80

Figura 43: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/glucosa irradiada a 652 W/m ²	80
Figura 44: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/sacarosa irradiada a 652 W/m ²	81
Figura 45: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/sin edulcorante irradiada a 652 W/m ²	81
Figura 46: Cinética de decoloración de Allura Red en presencia de edulcorantes.....	82
Figura 47: Cinética de decoloración de Tartrazina en presencia de edulcorantes.....	82
Figura 48: Ajustes de las curvas de cinética de decoloración (a) a 502 nm (Allura Red/fructosa) y (b) a 428 nm, para fotorreacciones realizadas en cubetas de 1 mm de paso.	83
Figura 49: Análisis en HPLC de edulcorantes en la formulación con Fructosa 42 irradiadas a 841 W/m ² a tiempos de irradiación: (a) 0 h; (b) 360 h.....	85
Figura 50: Análisis en HPLC de edulcorantes en la formulación con sacarosa irradiadas a 841 W/m ² , a tiempos de irradiación: (a) 0 h; (b) 360 h.....	86
Figura 51: Análisis en HPLC de Tartrazina en la formulación con Fructosa 42, irradiada a 841 W/m ² durante: (a) 0 h y (b) 360 h.....	87
Figura 52: Análisis en HPLC de Tartrazina en la formulación con sacarosa, irradiada a 841 W/m ² durante: (a) 0 h y (b) 360 h.....	88
Figura 53: Análisis en HPLC de Tartrazina en la formulación sin edulcorante, irradiada a 841 W/m ² durante: (a) 0 h y (b) 360 h.....	89
Figura 54: Cinética de decoloración de Tartrazina en la formulación con Fructosa 42, irradiada a 841 W/m ² durante: (a) 0 h; (b) 48 h; (c) 96 h.....	90
Figura 55: Cinética de decoloración de Allura Red en la formulación con Fructosa 42, irradiada a 841 W/m ² durante: (a) 0 h; (b) 48 h; (c) 96 h.....	91
Figura 56: Esquema propuesto para la reacción de fructosa con un compuesto arilazoico en configuración <i>cis</i>	95
Figura 57 Comparación de geometría de la <i>trans</i> -fructosa (forma enodiol) calculada en PM6 (semiempírico) a vacío y en solución (agua como disolvente).....	96
Figura 58. Comparación de geometría de la <i>cis</i> -fructuosa (forma enodiol) calculada en PM6 (semiempírico) a vacío y en solución (agua como disolvente).....	96
Figura 59. <i>trans</i> -Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico).....	97
Figura 60. <i>trans</i> -Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico).....	98
Figura 61. <i>cis</i> -Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico).....	98
Figura 62. <i>cis</i> -Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico).....	99

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de la pérdida de color en un licor tipo Amaretto bajo condiciones controladas de luz, demostrándose un claro efecto de la irradiancia sobre la tasa de decoloración y una completa estabilidad del color en ausencia de luz. La identidad del edulcorante principal es determinante para la tasa de decoloración bajo irradiación, observándose una persistencia del color en las formulaciones sin edulcorante o endulzadas con sacarosa en lugar de Fructosa 42. Estas diferencias fueron más marcadas en experimentos con mezclas que fueron químicamente definidas, las cuales contenían Tartrazina o Allura Red, con varios edulcorantes alternativos, en una solución de etanol 28% (v/v); a concentraciones de 14% (p/v), D-fructosa o D-glucosa causaron fotodecoloración, mientras que no se observó pérdida de color en presencia de sacarosa o en ausencia de cualquier azúcar añadido. Una posible interpretación de los resultados es en términos de una reacción redox de azúcares reductores con los compuestos azoicos, con la luz favoreciendo la conversión del compuesto azoico de la configuración predominante trans a la configuración cis, la cual se presta mejor a la reacción concertada y cíclica con el azúcar reductor. Los resultados demuestran que el uso de jarabe de fructosa como edulcorante no puede ser automáticamente extensivo a todos los sistemas alimenticios, pues se demuestra que algunas interacciones provocan efectos secundarios indeseables.

ABSTRACT

Studies on the color loss in an amaretto-type liqueur under controlled light conditions showed a clear dependence of the decoloration rate on the light intensity, and complete color stability in the absence of light. The principal sweetener used in the preparation of the liqueur strongly affected the rate of color loss under irradiation, color stability being much greater for the formulations containing sucrose or no added sweetener instead of fructose 42. These differences were more pronounced in experiments conducted with chemically well defined mixtures which contained either of the two azo dyes used in the coloration of the Amaretto, tartrazine and Allura Red, and various alternative sweeteners, in 28% (v/v) ethanol solution: D-fructose and, to a lesser extent, D-glucose, at concentrations of 14% (w/v), were effective in bringing about photodecoloration, while no color loss was detected in the presence of sucrose, or in the absence of any added sugar. The results are interpreted in terms of a redox reaction of reducing sugars with the diarylazo compounds, the function of the light being the conversion of the azo compound from the predominant *trans* configuration to the *cis* configuration, which on geometric grounds lends itself better to a concerted, cyclical redox reaction with the reducing sugar. The results of this work show that the use of high-fructose syrup cannot be automatically extended to all food systems, as some interactions may cause undesirable side effects.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

El uso de aditivos en alimentos tiene la finalidad de hacer mejoras organolépticas, de conservación o económicas en los productos en que se emplean e incluye una gran variedad, como pueden ser texturizantes, saborizantes y colorantes entre muchos otros. (Madrid, 1993). El empleo de ellos en la industria ha llevado a su uso extenso en la búsqueda de la mejora funcional, organoléptica y/o tecnológica de los productos de consumo masivo. Sin embargo, la interacción de estos aditivos con los ingredientes de la formulación, pueden provocar resultados inesperados. Tal es el caso de una reacción de degradación de color que ocurre en un licor tipo Amaretto, el cual sufre cambios en el color, hasta quedar prácticamente incoloro en comparación con su estado original de producción.

Esta observación del problema dio la pauta para comenzar a investigar la causa de dicho fenómeno.

Los aspectos más importantes de este trabajo son: la comprobación de la degradación del color en las condiciones referidas, la medición de la velocidad de pérdida de color en condiciones controladas, tratamiento por separado de los aditivos de color para determinar la influencia de diversos factores en el proceso de decoloración y la medición de la factibilidad termodinámica de la reacción propuesta.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

Antecedentes

2.1. Licores

Indica la Norma Oficial Mexicana las siguientes definiciones:

Licores, productos elaborados a base de bebidas alcohólicas destiladas, espíritu neutro, alcohol de calidad o común o mezcla de ellos y agua, aromatizados y saborizados con procedimientos específicos y a los cuales pueden agregarse ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaría (NOM 142 1995).

Sin embargo una definición más acorde con el tipo de producto del cual se ocupa nuestra investigación es la siguiente:

Los licores son espíritus (aguardientes) aromatizados obtenidos ya sea por maceración de sustancias vegetales, por destilación de dichas sustancias en presencia de alcohol o de agua; mediante el empleo combinado de estos procedimientos, edulcorados o no por medio de sacarosa, glucosa, fructosa o miel y coloreados o no, mediante colorantes naturales.

El licor denominado Amaretto es un producto que tiene su origen en Italia y que fue inventado en 1525 y hasta nuestros días se ha convertido en un licor esencial tanto para la elaboración de cocteles (Amaretto Sour, Italian Sunset, Alabama Slammer, French Connection, Godfather) como de postres (Panna cotta con Amaretto).

Originalmente el Amaretto es un licor en el que se combinan el dulzor de los huesos de albaricoque con el amargor de las almendras, adicionados de alcohol puro, azúcar caramelizado y la esencia de diecisiete plantas y frutas aromáticas entre las que destaca de forma especial la vainilla (Boyd, 2006). Su graduación alcohólica suele rondar los 25 grados y no supera en ningún caso los 30. Las bebidas que se han desarrollado alrededor del mundo tratando de igualar estas características son variadas, pero siempre buscando conseguir su color característico café rojizo que es un atributo central reconocido y valorado por el cliente.

2.2. Color

El sentido físico de las propiedades ópticas de los alimentos, como de cualquier otro material, son las que derivan de los fenómenos de transformación de la luz que incide sobre ellos: transparencia, turbiedad, color y brillo. La transparencia y la opacidad, relacionadas con la cantidad de luz que el material deja pasar a través de sí o la turbiedad, relacionada con el fenómeno de difusión en el seno del material, se aprecian junto con el color. Estas propiedades conforman mayoritariamente el aspecto visual de los alimentos y bebidas.

Se entiende por color aquella parte de la energía radiante que se percibe mediante la estimulación de la retina ocular (longitudes de onda entre 380 y 780 nm). En la Tabla 1 se muestra la relación entre las longitudes de onda y los colores percibidos (Restrepo, 2007)

Tabla 1: Relación entre las longitudes de onda y los colores percibidos

Color	Longitud de Onda
Rojo	~ 625-740 nm
Naranja	~ 590-625 nm
Amarillo	~ 565-590 nm
Verde	~ 520-565 nm
Cian	~ 500-520 nm
Azul	~ 450-500 nm
Añil	~ 430-450 nm
Violeta	~ 380-430 nm

Existen pocas publicaciones que referencien sobre el desarrollo de color y estabilidad en bebidas alcohólicas. Algunas proporcionan información sobre vinos tintos, por ejemplo en el trabajo de Revilla y González-San José (2003) y el de Ruíz Hernández (2004), quienes examinaron varios procesos, algunos de los cuales de tipo enzimático, involucrados en la

formación y en la pérdida de color. En cambio, en la manufactura de los licores, no están involucrados procesos enzimáticos. Estas bebidas son producidas por métodos simples como la maceración, infusión, o destilación de varias sustancias, las cuales contienen alcoholes de frutas o agaves, o la adición de extractos aromáticos o esencias y saborizantes artificiales. Por otro lado, Rodríguez y col. (1991) reportaron que los cambios en las condiciones de almacenamiento provocan cambios en el color en una bebida alcohólica de naranja, aunque sin ofrecer un mecanismo racional para los procesos involucrados.

Para las bebidas, así como los productos alimenticios, la apariencia visual es un factor determinante para su aceptación por el consumidor. Estas características visuales también funcionan como un indicador de calidad (Arnaud y col., 2000). Por lo tanto, la estabilidad del color durante el almacenamiento es una preocupación central de su manufactura y del subsecuente manejo, tal como se plantea en el origen del problema.

2.2.1. Colorantes

Los colorantes en alimentos y bebidas suelen ser muy diferentes y es difícil encontrar una clasificación adecuada, aunque se pueden distinguir a qué grupos pertenecen según su estructura química: azoicos, xanténicos, quinoleínicos, trifenilmetánicos (colorantes derivados del trifenilmetano), indigóides (colorantes derivados del índigo), ftalocianínicos (ftaleínas), etc.

2.2.1.1. Los colorantes azoicos

Para la investigación se determinó, a través del fabricante, que se emplean colorantes azoicos en la elaboración del licor tipo Amaretto, por lo cual se mencionan las características principales de estos compuestos.

Estos colorantes forman parte de una familia de sustancias orgánicas cuya fórmula general se muestra en la Figura 1. La parte central de la molécula consiste de dos átomos de nitrógeno unidos entre sí y a la vez enlazados a sendos anillos aromáticos. Todos se obtienen por síntesis química, no existiendo ninguno de ellos en la naturaleza. Se les ha acusado de ser capaces de producir reacciones de sensibilidad en personas alérgicas a la aspirina, aunque esto sólo se ha demostrado, en algunos casos, para uno de ellos, la Tartrazina (Combes y Haveland-Smith, 1982).

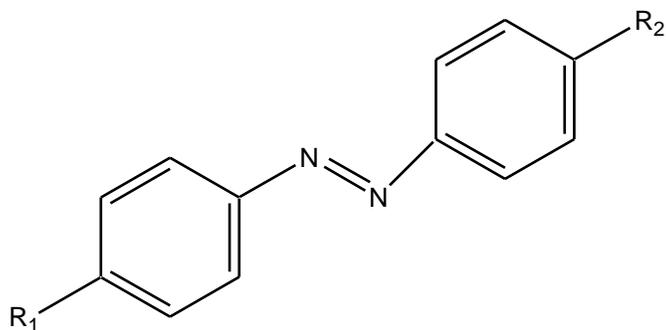


Figura 1: Fórmula general de los colorantes azoicos

Los colorantes azoicos, ampliamente usados en productos alimenticios y bebidas, son sujetos a un proceso lento de decoloración cuando se exponen a la luz (von Elbe y Schwartz, 1996). Es conocido que estos compuestos pueden reaccionar con agentes reductores (López Cisneros y col., 2002).

Algunos colorantes azoicos con trazas de metales en el producto o en el envase, alteran el color, otros se degradan cuando son expuestos a ciertos azúcares, aldehídos, peróxidos y ácidos; también hay que resaltar el hecho de que no todos los colorantes son estables a todos los valores de pH (Calvo y Durán, 2005).

Los colorantes azoicos presentan isomerismo *cis-trans*, fenómeno que fue estudiado por Brode y colaboradores (1952), quienes registraron, usando técnicas rápidas especiales, el espectro de absorción del isómero *cis* del dimetilaminoazobenceno en solución de benceno. Tras irradiación prolongada de la banda principal de absorción del isómero *trans*, para aumentar la proporción de la forma *cis* en la mezcla, la reversión espectral ocurrió en un tiempo del orden de minutos. La conversión de la forma *trans* a la forma *cis* resultó en un recorrimiento de la banda principal de absorción hacia longitudes de onda menores (de 410 nm a 360 nm) y en la aparición de una nueva banda débil a longitud de onda mayor (460 nm).

Los dos tipos de colorantes que se usaron en el sistema de estudio son:

- a) Allura Red (Rojo 40)

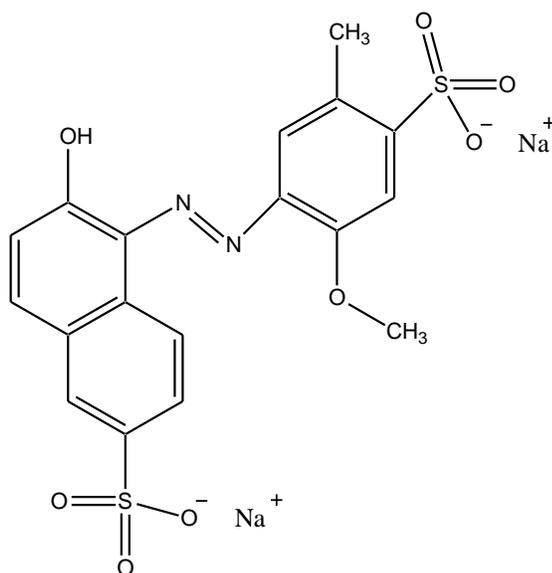


Figura 2: Allura Red

Fórmula molecular: $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$

Masa Molar: $496.42 \text{ g mol}^{-1}$

Apariencia: polvo rojo oscuro

Punto de fusión: $>300^\circ\text{C}$

Otros nombres: Allura Red, Food Red 17, C.I. 16035, FD&C Red 40, sal disódica del ácido 6-hidroxi-5-((2-metoxi-5-metil-4-sulfofenil) azo)-2-naftalen-sulfónico.

Se ofrece comercialmente como sal de sodio, aunque también puede existir como sal de calcio y potasio. Es soluble en agua, en la cual tiene su máxima absorción a los 502 nm.

b) Tartrazina (Amarillo 5)

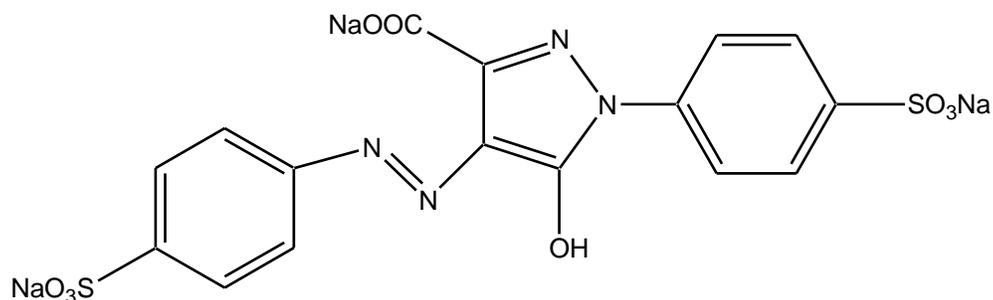


Figura 3: Tartrazina

Fórmula Molecular: $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$

Masa Molar: 534.3 g mol^{-1}

Nombre IUPAC: ácido 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-4-[4-sulfofenil]azol-1-H-pirazol-3-carboxílico, sal trisódica (Jain y col., 2003).

Su uso está autorizado en más de sesenta países, incluyendo la CE y Estados Unidos.

Es un colorante ampliamente utilizado, por ejemplo, en productos de repostería, fabricación de galletas, derivados cárnicos, sopas preparadas, conservas vegetales, helados y caramelos, o en la elaboración de bebidas refrescantes, a las que confiere color de "amarillo-limón".

Se presenta en forma de polvo brillante, de color amarillo-naranja, es inolora, higroscópica, estable en ácidos, soluble en agua y poco soluble en etanol. En condiciones alcalinas adquiere una coloración rojiza (Restrepo, 2007).

2.2.1.2. Reacciones de colorantes azoicos

Los colorantes son una de las materias primas más utilizadas en las industrias alimenticias, farmacéuticas y textiles, entre otras. A nivel mundial se utilizan unos 10,000 colorantes diferentes, y a finales de los 1980s se estimaba una producción anual total de alrededor de 700,000 toneladas (Zollinger, 1987). Cerca del 15% de estos productos es liberado al ambiente sin ningún tratamiento (Arroyave Rojas y col., 2008).

La presencia de colorantes en los cuerpos de agua tiene graves consecuencias ambientales. Por un lado dificultan la difusión del oxígeno y la luz y, al mismo tiempo, producen un

aspecto antiestético. Adicionalmente estos compuestos, debido a su naturaleza química, son persistentes en el ambiente y algunos de los productos de su degradación son cancerígenos (Arroyave Rojas y col., 2008).

La gran mayoría de los colorantes en uso industrial son colorantes azoicos. Su estructura química se caracteriza por un grupo azo ($-N=N-$) conjugado con anillos aromáticos en ambos extremos. El desarrollo y la optimización de métodos para la producción de estos compuestos fueron parte fundamental de los avances de la química orgánica industrial en la segunda mitad del siglo XIX. Se estableció un método generalizado para la síntesis a gran escala de colorantes azo, que consiste en la diazotización de una arilamina, seguido del acoplamiento de la sal de diazonio con otra molécula aromática. Esta metodología de amplia aplicabilidad, en conjunción con la disponibilidad de numerosos compuestos fenílicos y naftílicos que pueden servir como precursores de los grupos R y R' en la fórmula general $R-N=N-R'$, permite sintetizar una amplia gama de compuestos arilazo, por diferentes combinaciones de los grupos R y R'. Los azoarenos accesibles de esta manera representan una gran variedad de colores y otras características de importancia para su potencial aplicabilidad en el ámbito económico, como son la estabilidad del color en diferentes condiciones, solubilidad en diversos solventes, cambios reversibles del color a diferentes valores de pH, persistencia en el tejido durante el lavado, toxicidad, degradabilidad, etc.

En función del tipo de los núcleos aromáticos enlazados al grupo azo, y de los sustituyentes en estos grupos, cambia la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}), que evidencian los colorantes azoicos en solución acuosa, y con ello su color. La Tabla 2 reúne datos de λ_{max} para algunos de estos colorantes. Estas bandas de absorción en la región visible del espectro se deben a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema azo conjugado. Estas transiciones se caracterizan por altos valores del coeficiente molar de absorción, en la longitud de máxima absorción (ϵ_{max}), por lo general por encima de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los valores de ϵ_{max} en el espectro visible, para varios colorantes azoicos son los siguientes: Amaranto: $\epsilon_{522} = 2.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Rojo 40: $\epsilon_{505} = 2.81 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ross, 1975).

Tabla 2: Longitudes de onda de máxima absorción de colorantes azoicos

Colorante Azoico	Longitud de onda de absorción máxima
Tartrazina. E 102	~ 428 nm
Amarillo anaranjado S. E 110	~ 485 nm
Azorrubina. Carmoisina. E 122	~ 516 nm
Amaranto. E 123	~ 520 nm
Rojo cochinilla. Rojo Ponceau 4R. E 124	~ 505 nm
Rojo 2G. E 128	~ 532 nm
Rojo Allura AC. E 129	~ 504 nm

(Miniotti y col., 2007)

La Tartrazina es ampliamente utilizada en la industria alimenticia. Aunque es inocua en bajas concentraciones, su ingestión en cantidades mayores a la ingesta diaria admisible (IDA) de 7.7 miligramos por kilogramo de peso corporal puede provocar reacciones alérgicas, como asma y urticaria (Restrepo, 2007).

De esta forma, se observa un potencial riesgo en aguas contaminadas con Tartrazina, la cual se debe remover de los vertimientos de las industrias de alimentos.

Actualmente existen varias tecnologías disponibles para el tratamiento de efluentes con colorantes, entre éstas hay algunos métodos físico-químicos como adsorción, coagulación-floculación, oxidación avanzada y filtración en membranas. Estos métodos pueden llegar a ser muy efectivos, aunque muchas veces son complejos y de difícil aplicación a gran escala.

Más prometedoras en este sentido son las metodologías químicas o enzimáticas para la conversión de los compuestos arilazoicos, ya sea por la vía oxidativa o por la vía reductiva. La literatura sobre estos procesos se resume a seguir.

Oxidación de los compuestos arilazoicos

Se han publicado numerosos trabajos sobre la oxidación de estos compuestos, generalmente con la justificación de desarrollar métodos eficientes para su degradación. Muchos de los estudios se centraron en la oxidación de los compuestos azo en solución acuosa, mediada por dióxido de titanio bajo irradiación UV. En este sistema, el efecto primario de los fotones incidentes en el semiconductor es la formación de electrones y huecos. Estos últimos son el agente inicial de la cadena oxidativa, pero no actúan directamente sobre los compuestos azo, sino que reaccionan con el agua formando radicales hidroxilo, OH[•] (Daneshvar y col., 2003), los cuales difunden por la solución acuosa y degradan los compuestos azoicos. Con eso, el paso limitante para la cinética de degradación de estos compuestos ocurre en solución libre, lo que hace que la reacción se dé con mayor eficiencia. Si la degradación de los compuestos arilazo se diera sólo en la superficie del semiconductor, sería demasiado lenta como para ser de interés para la remediación de efluvios que contienen estos compuestos. En estas reacciones, la funcionalidad azo acaba en forma de gas de nitrógeno, N₂ (Puzenat y col., 2003). En algunos casos, esta reacción se ha realizado en presencia de H₂O₂ añadido (Daneshvar y col., 2005). Con esta metodología general se han degradado los colorantes azoicos Negro 5 (Reutergårdh y Iangphasuk, 1977), Rojo 14 (Daneshvar y col., 2003), Naranja 7, Naranja 8, Naranja 52 y Azul 74 (todos por Daneshvar y col., 2005), así como Rojo Congo y Amaranto (ambos por Puzenat y col., 2003).

Una variante interesante de este tipo de reacción fue reportada por Kunitou y col. (2002), quienes estudiaron la decoloración fotocatalítica con lámpara de mercurio de alta presión, de varios compuestos azo, como también de otros colorantes de los tipos trifenilmetilo, ftalocianina, índigo y antraquinona, bajo atmósfera de N₂, sobre TiO₂, en presencia de varios monosacáridos y disacáridos. Observaron para los colorantes azoicos la formación casi estequiométrica de las arilaminas esperadas.

Un gran número de trabajos sobre la oxidación de colorantes azoicos se realizaron con la reacción de Fenton, que es reconocida como una de las más clásicas y más poderosas de oxidación en ambiente acuoso. También en este caso, el agente que ataca al compuesto azo es el radical hidroxilo.

El reactivo de Fenton es una mezcla de sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno que produce el ion férrico (Fe^{3+}) y el radical libre hidroxilo (OH^\cdot). Este radical es el agente oxidante más potente después del flúor (OH^\cdot , $E_0 = -2.8 \text{ V vs. F}_2$, $E_0 = -3.0 \text{ V}$), capaz de oxidar una amplia gama de compuestos orgánicos. Cuando se genera una concentración suficiente de radical libre hidroxilo y otros radicales, estas oxidaciones pueden llevar a una mineralización total.

Con esta química, Spadaro y col. (1994) demostraron la degradación de 6 diferentes colorantes azoicos, y Parac-Osterman y col. (2004) reportaron la degradación de Acid Blue 158.

Por lo general, la oxidación de Fenton se realiza como reacción oscura, pero recientemente se ha demostrado que el poder oxidante de esta reacción puede ser incrementado significativamente empleando radiación ultravioleta o ultravioleta/visible (reacción de Fotofenton), lo cual ha generado estudios para descomponer una gran cantidad de compuestos refractarios. Con este método se logró la remoción y degradación de Tartrazina hasta con un 99.3% de efectividad (Arroyave Rojas y col., 2008). Xu y col. (2004) estudiaron la decoloración de 20 colorantes, en su mayoría del tipo azoico, con este método, logrando buenos rendimientos en el caso de los azoarenos. Particularmente en el caso de la Tartrazina se obtuvo 100% de remoción por oxidación química con diversas cantidades de Fe^{2+} y peróxido de hidrógeno. Con esto Arroyave Rojas y col. (2008) aportan un avance en el tratamiento de colorantes azoicos en los desechos industriales de la industria de alimentos.

El método más directo para la generación de radicales hidroxilo es a través del fotoclivaje del peróxido de hidrógeno mediante radiación UV. El peróxido de hidrógeno es un reactivo químico relativamente barato y fácilmente accesible. En solución acuosa, se disocia rápidamente con la luz ultravioleta produciendo radicales hidroxilo. Estos radicales reaccionan típicamente entre 106 y 1012 veces más rápido que otros oxidantes como el ozono o el mismo peróxido de hidrógeno. Considerando las escalas respectivas, se puede apreciar el efecto de la luz sobre un sistema de fotodegradación (López Cisneros y col., 2002).

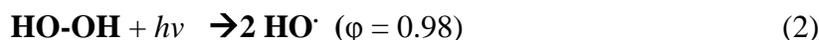
Para la degradación de los colorantes azoicos bajo iluminación en presencia de H₂O₂ se pueden proponer las reacciones que se listan a continuación (López Cisneros y col., 2002):

La reacción completa está dada por la siguiente ecuación:



El mecanismo propuesto para esta reacción es el siguiente:

a) Formación del radical hidroxilo



donde φ es el rendimiento cuántico para la disociación de H₂O₂.

b) Reacción del colorante con los radicales



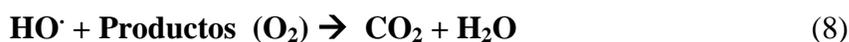
Éste es un esquema simplificado que ocurre a través de varias etapas y con la formación de distintos intermediarios.

c) Reacciones competitivas

En exceso de peróxido y con altas concentraciones de HO \cdot ocurren reacciones competitivas, que producen un efecto inhibitorio para la degradación del colorante. El radical HO \cdot tiende a recombinarse o a reaccionar de acuerdo al esquema de Haber y Willstätter (López Cisneros y col., 2002):



d) Mineralización de los productos en presencia de oxígeno



También puede tener lugar la fotólisis directa del colorante, pero su velocidad es muy lenta. Se llevaría a cabo mediante la siguiente reacción:



donde los productos podrían ser los mismos o distintos a los de la ecuación (1) (López Cisneros y col., 2002).

El proceso UV/H₂O₂ es capaz de oxidar todos los contaminantes orgánicos a dióxido de carbono (CO₂) y agua; sin embargo, en algunos casos, la mineralización total requerirá una gran potencia y dosis de oxidante y, por lo tanto, alto capital y elevados costos de operación en comparación con tecnologías de tratamiento convencionales, tales como la remoción con aire y adsorción en carbono activado (Arroyave Rojas y col., 2008).

Aunque menos atractiva que la oxidación química, por los mayores costos involucrados, la oxidación anódica de colorantes azo en reactores especialmente contruidos también ha sido estudiada (Sakalis y col., 2005; Sakalis y col., 2006). Los cátodos empleados fueron de lana de carbono y los ánodos de titanio platinizado o de niobio cubierto de diamante sintético dopado con boro. La degradación de los azoarenos se vio acelerada por adición de cloruro de sodio a la solución, probablemente por la formación anódica de hipocloruro de sodio, que luego puede atacar oxidativamente a los compuestos orgánicos en todo el volumen de la solución. Con estas técnicas se degradaron los colorantes azoicos Naranja 91, Rojo 184, Azul 182 y Negro 5 (Sakalis y col., 2005).

También se han estudiado métodos biológicos para la degradación oxidativa de los compuestos arilazo. Pagga y Brown (1986) examinaron a 87 colorantes azoicos en cuanto a su eliminación, en condiciones aerobias, con limo activado derivado de plantas de tratamiento de aguas servidas. Sobre la base de estos estudios, 18 de los colorantes fueron clasificados como biodegradables; 22 de los colorantes no fueron degradados ni por el criterio de decoloración ni por el criterio de carbono orgánico disuelto. Franciscon y col. (2009) estudiaron la biodegradación de varios colorantes azoicos (Amarillo 107, Rojo 198, Negro 5, Azul 71) usados en la industrial textil mediante una cepa de *Staphylococcus arlettae* en un proceso secuencial microaerofílico/aerobio, con extracto de levadura añadido.

Reducción de los compuestos arilazoicos

La reducción de los compuestos arilazo se logra con una variedad de agentes químicos. Braude y col. (1954) redujeron al azobenceno por hidrogenólisis sobre Pd/C en tetrahidrofurano al reflujo, con ciclohexano como donador de hidrógeno, completándose la reacción en 23 horas, con formación prácticamente estequiométrica del producto esperado, anilina. Jnaneshwara y col. (1998) usaron un abordamiento análogo, con formiato de amonio como donador de hidrógeno, en solución metanólica, con una variedad de compuestos arilazo, obteniendo altos rendimientos de las correspondientes arilaminas.

Un método diferente fue reportado por Dosa y col. (1996), quienes lograron una reducción rápida de azobencenos con borohidruro de titanoceno, en diglyme a 125°C, produciéndose las anilinas correspondientes.

Zinc metálico ha sido utilizado exitosamente por varios grupos en la reducción de azoarenos. Gowda y col. (2002) examinaron 15 compuestos arilazoicos en su reacción con polvo de zinc y ácido fórmico o formiato de amonio en metanol bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente, formándose en todos los casos las arilaminas correspondientes en rendimiento prácticamente cuantitativo. Sridhara y col. (2004) describieron la reacción de varios compuestos arilazo (a 0.67 M) con zinc en polvo (1.34 M) en metanol u otro solvente apropiado, bajo nitrógeno, a temperatura ambiente, produciéndose las correspondientes arilaminas en rendimientos superiores a 90%, en tiempos de reacción de 5 a 20 minutos.

La reducción de azoarenos por hidracina ha sido reseñada por Rollas (2010). Pasha y Nanjundaswami (2005) describieron cómo hidracina al 3 M, en solución etanólica a temperatura de reflujo, redujo cuantitativamente a 11 diferentes compuestos arilazoicos, con tiempos de reacción del orden de 20 minutos. A temperaturas más bajas la reducción con hidracina puede ser limitada a la formación de la N,N'-diarilhidracina correspondiente al azoareno inicial, como en el trabajo de Zhang y Wang (2003), quienes reportaron rendimientos cuantitativos para esta reducción parcial en el caso de 12 compuestos arilazo, usando hidracina al 3 M, en solución etanólica, a 60°C, con tiempos de reacción entre 20 minutos y 3 horas. La reducción de los azoarenos también puede ser limitada a la

formación de las N,N'-diarilhidracinas si el reactivo hidracina (o hidracinas mono-N-alquiladas o mono-N-ariladas) se utiliza en cantidades estequiométricas (Koppes y col., 2008).

Ross (1975) reportó la degradación de Amaranto y de Rojo 40 a temperaturas elevadas en solución acuosa de fructosa o glucosa, con formación de las N,N'-diarilhidracinas y anilinas esperadas.

También existen otros agentes químicos reductores, como el sulfuro de sodio (Na₂S), que son muy comunes en sistemas de tratamiento de aguas residuales y que son capaces de reducir químicamente a los colorantes azo; ya sea por reducción química directa, o bien por reducción química asistida por un mediador redox (van der Zee, 2002). Los mecanismos biológicos y químicos que reporta van der Zee (2002) se representan en la Figura 4.

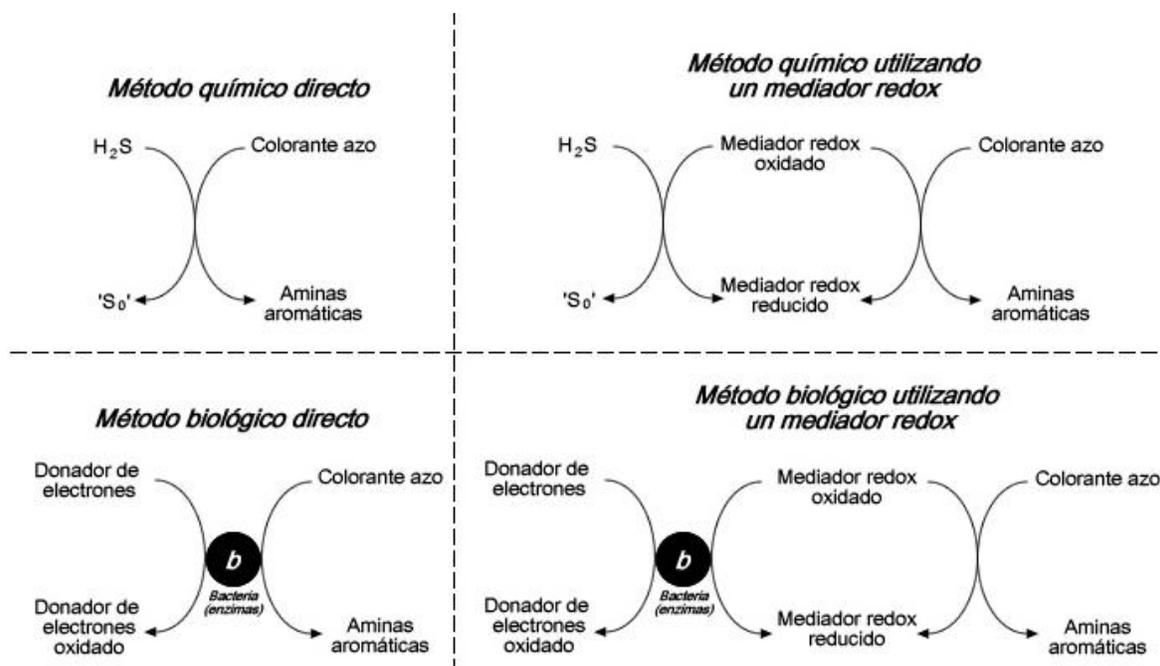


Figura 4: Principales mecanismos biológicos y químicos en la reducción de colorantes azoicos a aminas aromáticas

(Adaptado de van der Zee, 2002)

La reducción de azoareneos también se puede realizar por métodos electrolíticos. Bechthold y col. (2001) describen la decoloración reductiva directa de una serie de colorantes textiles azoicos (CI Acid Red 27, CI Acid Yellow 9, CI Reactive Red 4, CI Reactive Orange 4, CI Reactive Black 5, Reactive Yellow 17) en un electrolizador multicatódico, con cátodos formados de tela de acero. Fernández-Sanchis (2006) efectuó la reducción catódica, bajo argón, del colorante azoico, Sunset Yellow FCF, en celdas electrolíticas experimentales con cátodos de lana de carbono y ánodos de alambre de titanio platinizado, en soluciones acuosas desoxigenadas, a valores de pH de 5, 7 y 10, y potenciales catódicos de entre -0.75 V y -2 V, logrando la conversión del compuesto azo a sus correspondientes componentes amínicos en pocos minutos.

También se han estudiado métodos para la reducción microbiológica de los azoarenos. La reseña de Delée y col. (1998) recoge los resultados publicados hasta 1997 sobre tratamientos anaeróbicos de efluvios textiles. Brown y Laboureur (1983) examinaron 12 colorantes tipo azo (y otros 10 colorantes de otros tipos) en cuanto a su decoloración en condiciones anaerobias en presencia de un limo de plantas tratadoras de desagües, logrando en todos los compuestos azo un alto grado de decoloración. Chen (2002) examinó la decoloración anaerobia de los colorantes azoicos Reactive Acid Yellow, Reactive Black B y Reactive Red 22 por la acción del anaerobio facultativo *Pseudomonas luteola*, determinando los umbrales de toxicidad de estos azoarenos para el microorganismo. Demostró que la azoreductasa responsable de la biodegradación de los colorantes es reprimida por oxígeno, pero un mínimo de oxígeno se requiere para mantener la actividad celular básica para la decoloración. En condiciones de inviabilidad de las células, una decoloración de la solución aún puede tener lugar mediante biosorción. Mezőhegyi y col. (2008) describieron el uso de carbono biológicamente activado en un reactor de flujo continuo ascendente, para llevar a cabo la reducción anaerobia de Acid Orange 7. Li y Guthrie (2010) usaron células de *Shewanella* inmovilizadas en celulosa para la decoloración del colorante Remazol Black B.

Ozdemir y col. (2006) examinaron la acción de los microorganismos *Proteus vulgaris*, *Providentia rettgeri* y *Aeromonas hydrophila* sobre los siguientes colorantes utilizados en

la tinción de pieles: Acid Black 24, Acid Black 210, Acid Brown 165, Acid Green 20, Acid Yellow 36 y Acid Blue 7. No queda claro si esto fue en condiciones aerobias o anaerobias. El mismo grupo (Ozdemir y col., 2008) también estudió el uso de la bacteria marina *Vibrio harveyi* TEMS1 para la decoloración de varios azoarenos y observó que el uso de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo redundaba en distintos efectos sobre la decoloración. También notaron efectos diferenciales de acuerdo al sustrato: el sistema es eficiente para Acid Black 210, ineficiente para Acid Blue 7. Sin embargo, no se definió si la decoloración lograda fue una biorreducción o adsorción de los colorantes a la biomasa.

Cultivos definidos de bacterias intestinales también se han estudiado en este contexto. Chung y col. (1978) examinaron bacterias de 10 diferentes géneros (*Coprococcus catus*, *Acidaminococcus fermentans*, *Fusobacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium infantis*, *Eubacterium bifforme*, *Peptostreptococcus productus II*, *Citrobacter* sp., *Peptostreptococcus productus I*, *Fusobacterium* sp. II) en experimentos anaerobios *in vitro*, en cuanto a su aptitud para reducir 7 diferentes colorantes azoicos (Tartrazina, Ponceau SX, Sunset Yellow, Methyl Orange, Orange II, Amaranto, Allura Red 40), en presencia de flavina mononucleótido u otros portadores de electrones. Es interesante notar que diferentes bacterias evidenciaron diferentes eficiencias para su reacción con los diferentes colorantes.

También se han estudiado las azorreductasas aisladas de bacterias intestinales. Rafii y Cerniglia (1995) describieron como las bacterias intestinales *Clostridium* y *Eubacterium* constitutivamente expresan azorreductasas que pueden reducir al Azul 15 en condiciones anaerobias. La misma enzima también reduce nitroaromáticos. Macwana y col. (2010) expresaron la azorreductasa Azo F1 de *Enterococcus faecium* heterologicamente, para purificarla y caracterizarla. La compararon con la azorreductasa Azo A de *Enterococcus faecalis*, encontrando tanto similitudes como diferencias. Azo F1 puede utilizar tanto NADH como NADPH como cofactor para la reducción de colorantes azo. Para la reducción de Methyl Red, la Azo F1 es catalíticamente menos efectiva que la Azo A.

Por lo general, la destoxificación de los azoarenos por reducción no es una modalidad atractiva, por llevar a la formación de arilaminas, compuestos problemáticos por su potencial acción mutágena (Hartman y col., 1979). En ese sentido, la descomposición de

los compuestos arilazo por oxidación es preferible, y en este contexto el uso del vocablo “mineralización” es común, por la formación de N₂, un gas inofensivo. Sin embargo, incluso en este caso se necesita considerar el destino de los grupos arilo, que también puede ser problemático. Por ejemplo, en la oxidación del azobenceno por la reacción de Fenton, se demostró la producción de benceno (Spadaro y col., 1994), un compuesto reconocido como cancerígeno (Fourth Annual Review of Carcinogens, 1985).

Otras reacciones de los azoarenos

Teóricamente, el enlace químico de compuestos azoicos se puede romper por acción de la energía luminosa. Sin embargo, investigaciones recientes (López Cisneros y col., 2002) demuestran que éste es un proceso lento, y que podría incrementarse notablemente con la presencia de especies altamente reactivas en el medio de reacción, que inicien el proceso de oxidación.

Los compuestos arilazoicos ocurren en dos configuraciones definidas, *cis* y *trans*. De éstas, la última siempre es claramente preponderante en el equilibrio, y por lo tanto el espectro de absorción de las soluciones de compuestos arilazoicos es el espectro del isómero *trans*. El espectro del isómero *cis* sólo puede ser registrado utilizando técnicas rápidas especiales. La interconversión de las formas *cis* y *trans* de los azoarenos se puede dar de forma térmica o fotoquímica. Para esta última modalidad, fotoconversión de los isómeros, el caso mejor documentado es el del p-dimetilaminoazobenceno en solución bencénica, estudiado por Brode y col. (1952). Estos investigadores determinaron, usando técnicas rápidas, el espectro de absorción del isómero *cis*, que muestra, en comparación con el isómero *trans*, un recorrimiento de la banda principal de absorción hacia longitudes de onda menores (de 410 nm a 360 nm) y, además, la aparición de una nueva banda débil a longitud de onda mayor (460 nm). Tras irradiación prolongada de la banda principal de absorción del isómero *trans*, la reversión espectral ocurrió en un tiempo del orden de minutos. Notaron efectos espectrales similares en la conversión por irradiación de la forma *trans* del 4-cloro-4'-hidroxiazobenceno a la forma *cis*, con recorrimiento de la banda principal de 350 nm a 305 nm y formación de una nueva banda débil a 450 nm.

Para un ejemplo de las eficiencias de estas fotointerconversiones se puede citar el trabajo de Gabor y Bar-Eli (1968), quienes determinaron rendimientos cuánticos de 0.115 y 0.35, respectivamente, para las conversiones *trans*→*cis* y *cis*→*trans*, en 1,1'-dimetoxiazobenceno en solución de metilciclopentano a -80°C, con irradiación a 365 nm.

Un tratamiento teórico de la isomerización *cis-trans* fotoinducida en colorantes azoicos en presencia de campos eléctricos, para la preparación de capas fotosensibles, ha sido presentado por Simonov y Lavrichev (1999).

Reacciones biológicas

En la biodegradación anaerobia, para ser degradados, los colorantes deben reducirse primeramente por el enlace azo que forma la parte central del grupo cromóforo, y para esto, la molécula debe de ser el aceptor de electrones en la reacción. El problema con la degradación anaerobia es que las cinéticas son lentas, por lo tanto, para hacer más eficientes los procesos anaerobios se ha investigado el uso de sustancias o materiales que actúen como mediadores redox y aceleren la cinética de reducción; se ha reportado que el factor limitante en la degradación de estos compuestos es la transferencia de electrones, ya que son necesarios 4 electrones para romper un enlace azo. Los mediadores redox que se han analizado son las sustancias húmicas ricas en quinonas, como por ejemplo la antraquinona 2,6-disulfonato (AQDS) (González, 2008).

La función de un mediador redox es transportar electrones de una molécula donadora de electrones a otra receptora. Este tipo de moléculas se ha utilizado para la degradación de otros compuestos xenobióticos. Bhushan y col. (2006) utilizaron Fe (III), ácido húmico y AQDS como mediadores redox en la degradación de nitro-aminas cíclicas (triazinas y similares) y encontraron que estos mediadores redox no sólo aceleran la reacción, sino que estimulan el crecimiento de las bacterias; además, ayudan a hacer más biodisponibles las moléculas de contaminantes complejos para su degradación.

El uso de medios de soporte para fijar a microorganismos en biorreactores se ha probado para proveer a éstos de una superficie para su crecimiento y para la protección de sustancias inhibitoras. Estos medios de soporte deben de tener en preferencia una superficie rugosa y altamente porosa, características con las que cuenta el carbón activado, por lo que ya ha

sido usado para fijar microorganismos en biorreactores usados para remover y degradar contaminantes tóxicos, y se le ha llamado carbón activado biológicamente (González y Escamilla, 2008). Otros soportes han sido probados, tales como el grafito o alúmina, en un reactor de flujo continuo ascendente, para llevar a cabo la reducción anaerobia de Acid Orange 7, desarrollados por Mezohegyi y col. (2008).

En experimentos anaerobios, se investigó la aptitud de ciertas bacterias para reducir 7 diferentes colorantes azo (Tartrazina, Ponceau SX, Amarillo 6, Naranja de Metilo, Naranja II, Amaranto, Rojo 40), en presencia de flavina mononucleótido u otros portadores de electrones, obteniéndose diferencias entre ellas (Chung y col., 1978).

La investigación de diversos tipos de microorganismos en la degradación de colorantes ha tenido la finalidad de usarlos en los sistemas de tratamiento de aguas. Un ejemplo es el trabajo de Franciscon y col. (2009) donde usaron una cepa de *Staphylococcus arlettae* en un proceso secuencial microaerofílico/aerobio, con extracto de levadura añadido, para el tratamiento de colorantes azo provenientes de la industria textil. El trabajo de Li y Guthrie (2010) demuestra el uso de células de *Shewanella* inmovilizadas en un sistema de celulosa-monomero de ácido metacrílico sobre una base de celulosa-algodón, para la decoloración del colorante Remazol Black B. Macwana y col. (2010) usaron la azoreductasa Azo F1 de *Enterococcus faecium*, como cofactor para la reducción de colorantes azo.

También los tratamientos aerobios han sido estudiados, tal es el caso de Delée y colaboradores (1998) quienes reseñaron el tratamiento aerobio de efluvios de la industria textil para la remoción de colorantes, concluyendo que es una alternativa viable del tratamiento de aguas contaminadas por colorantes azo.

Una de las pocas investigaciones que hace referencia a la decoloración fotocatalítica de compuestos azo por efecto de monosacáridos es la reportada por Kunitou y col. (2002), quienes usaron al TiO_2 como fotocatalizador en solución acuosa saturada con nitrógeno. Ross (1975) reportó la degradación de colorantes azo por D-glucosa y D-fructosa, variando las condiciones de temperatura y pH, sin considerar incidencia de luz.

2.3. Edulcorantes

El uso de determinados tipos de edulcorantes en la industria tiene que ver con su disponibilidad. Originalmente, la caña de azúcar fue la única fuente de azúcar refinada, de tal manera que las regiones tropicales y subtropicales donde ésta crece ejercían el monopolio de la oferta. Sin embargo, en los últimos 200 años ese monopolio se ha venido contrayendo lentamente merced a la competencia de fuentes alternativas de sacarosa como la remolacha azucarera, y más recientemente, de alternativas a la misma sacarosa, de las cuales existen tres tipos distintos (Jenkins, 2001):

- 1. Edulcorantes calóricos:** tales como la isoglucosa (jarabe de maíz) y la inulina;
- 2. Superedulcorantes no calóricos sintéticos:** tales como la sacarina y el aspartame, que son sintetizados químicamente y no son calóricos; y la sucralosa.
- 3. Superedulcorantes no calóricos vegetales:** tales como la taumatina y el estevioside.

La fructosa (isoglucosa) es 70% más dulce y 30% más barata que el azúcar (en E.U.), y se produce en Estados Unidos (donde representa el 42% del mercado de edulcorantes), Canadá, México y algunos países de Asia. Si bien los gigantes de la industria de los refrescos, Coca Cola y Pepsi-Co, sustituyeron, ya hace cerca de veinte años, la sacarosa con fructosa en sus cadenas productivas de EE.UU., aún no han conseguido hacerlo en la Unión Europea (UE), donde las políticas proteccionistas sólo le dejan a la fructosa un pequeño nicho del mercado.

Mientras que los costos de producción de la caña de azúcar y la fructosa son en general similares, existen en el mercado opciones más baratas para los fabricantes de alimentos.

En la Tabla 3 se especifican los costos de producción de edulcorantes en función de su capacidad de endulzante, siendo la sacarosa el patrón de comparación. Los costos de producción marcan en muchos casos los parámetros de comercialización y aplicaciones industriales. Ciertas ventajas en el precio pueden propiciar cambios en formulaciones de alimentos.

Tabla 3: Costos promedio de producción de edulcorantes expresados en dólares de EE.UU. por tonelada equivalente de dulzor de edulcorante, para el 2000

Edulcorante	Costo de Producción (dólares/ton)
Azúcar de remolacha	703.6
Acesulfame-K	576.1
Aspartame	458.0
Azúcar de caña	340.3
Isoglucosa	292.7
Sacarina	13.9
Taumatina	1.2

(Adaptado de Jenkins, 2001)

La realidad en México es que existe un amplio espectro de bebidas a las que se agregan diferentes tipos y cantidad de edulcorantes. Pueden mencionarse las bebidas carbonatadas y no carbonatadas (refrescos) endulzadas por lo regular con sacarosa o jarabe de maíz (Fructosa 42). México es uno de los principales consumidores de refrescos *per capita* en el mundo. Además de estos refrescos, se incluyen el café y el té, una gran variedad de bebidas a base de jugos de fruta o soya, aguas frescas con cantidades importantes de azúcar, atoles, licores, bebidas energéticas y licuadas (bebidas de fruta con azúcar y leche entera). La sustitución de sacarosa por Fructosa 42 se ha debido a cuestiones de precio y/o tecnológicas, es decir de funcionalidad de los productos; sin embargo estos edulcorantes calóricos se han vinculado con problemas a la salud como la caries dental, consumo elevado de energía, consumo reducido de calcio y otros nutrimentos y aumento de peso, además de diabetes mellitus tipo 2 (Rivera y col., 2008).

Hay evidencia cada vez mayor acerca de otros efectos nocivos para la salud derivados del consumo de la fructosa como comentan Rivera y col. (2008). Aunque la hipótesis inicial de que el contenido de ésta modifica el equilibrio energético, parece no sostenerse; la fructosa se ha relacionado con el aumento de triglicéridos (Rivera y col., 2008). Se ha conjeturado

sobre otros efectos potenciales de la fructosa, como la enfermedad cardiorenal (Rivera y col., 2008).

En cuanto a la reactividad química de la fructosa cabe resaltar que el grupo carbonilo presente en todos los azúcares es muy reactivo y puede formar hemiacetales o cetales con otros compuestos hidroxílicos (Figura 5).

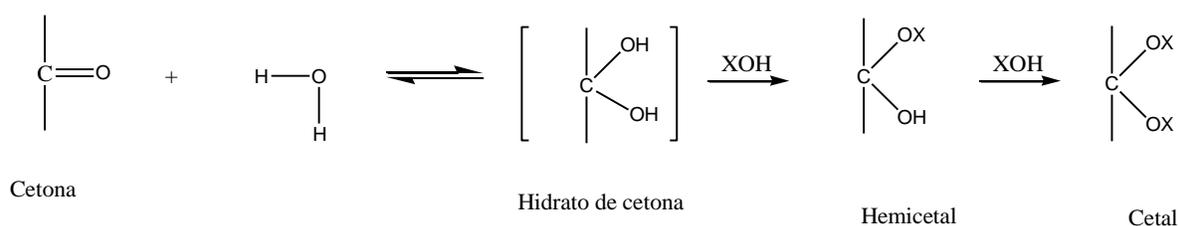


Figura 5: Reacciones de adición al grupo carbonilo

La fructosa puede formar una estructura cíclica interna por reacción del grupo hidroxilo en el carbono C₅ o C₆ con el grupo carbonilo formando un hemiacetal intramolecular, donde XOH es el resto de la molécula. El otro hidroxilo en el carbono C₁, conocido como el hidroxilo glicosídico, es muy reactivo y forma fácilmente enlaces glicosídicos con otros grupos hidroxílicos mediante la eliminación de agua. Si el compuesto hidroxílico no es un azúcar, se forma un glicósido, tal como sucede en la condensación de glucosa y metanol para dar metil glucósido. Sin embargo, el grupo hidroxilo frecuentemente proviene de otro azúcar y en este caso se forma un disacárido. Si el enlace no ocurre entre dos átomos C₁, entonces queda libre un grupo cetónico o aldehídico en el disacárido y la molécula exhibe todas las reacciones de estos grupos tales como la mutarrotación (Guthrie, 1974).

Las reacciones más estudiadas donde intervienen los azúcares reductores son las reacciones de Maillard, las cuales consisten en lo siguiente:

Los compuestos iniciales de la reacción de Maillard son identificados como productos de Amadori, cuyas características son: 1. Se forman espontáneamente (sin enzimas); 2. Interviene una base de Schiff formada con un aldehído + una amina primaria; por ejemplo, la hemoglobina glucosilada es un producto de Amadori típico que se utiliza como medida

del grado de control de la diabetes; 3. A través del tiempo los compuestos de Amadori pueden seguir evolucionando hacia complejos covalentes (Rossi, 2007).

Márquez y Añón (1986) estudiaron esta reacción de Maillard aplicada a las papas fritas, encontrando que controlando la cantidad de azúcares reductores podían controlar también el cambio de color de las mismas. También observaron que con sacarosa, prácticamente no existían cambios al final del freído de las papas.

De igual manera se ha investigado algunas combinaciones que inhiban las reacciones de Maillard, probando varios aminoácidos con azúcares reductores. Bedinghaus y Ockerman (1995) encontraron que la xilosa-lisina, xilosa-triptofano, dihidroacetona-histidina y dihidroxi-acetona-triptofano son más efectivos comparados con el control de glucosa. La reacción de Maillard así mismo se ve afectada por incremento en el pH, la temperatura y el contenido de azúcares reductores, tal como reporta Baxter (1995).

Estas interacciones con otros compuestos se dan básicamente por el poder de reducción de los monosacáridos y se refieren a la adición de hidrógeno a las moléculas o la cesión de electrones.

Por ejemplo, en la formación de radicales hidroxilo del poli(6-O-viniladipol-D-glucosa) [poli(VAG)], intervienen los grupos reductores del polímero para producir radicales hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss, usando peróxido de hidrógeno, el resultado es la degradación del polímero y la obtención de un resto de enodiol (Kitagawa, 2001).

Las características de reactividad de los azúcares sencillos están explicadas por las formas que adoptan dichos azúcares. Poseen propiedades de aldehídos o cetonas a pesar de existir en forma cíclica, debido a que en las disoluciones en equilibrio existen también estructuras de cadena abierta. Por ejemplo, para la glucosa reporta Macy (1975) que en solución acuosa dos tercios se hallan en la forma β , un tercio en la forma α , y sólo cantidades muy pequeñas en forma aldehídica de cadena abierta. En las disoluciones de fructosa, el azúcar cetónico, la situación es más complicada debido a su tendencia a formar estructuras cíclicas, tanto de 5 como de 6 átomos. Cuando están en forma cíclica no se identifican de forma adecuada los grupos reductores, pero cuando están en forma abierta presentan la propiedad típica de reductor (Macy, 1975).

De esta forma los azúcares reductores tienen las características necesarias para reaccionar con otras moléculas orgánicas.

La forma de identificar los azúcares generalmente se basa en sus reacciones características. Muchas reacciones de los monosacáridos, son debidas a la pequeña cantidad de forma abierta, acíclica, en equilibrio con las estructuras cíclicas. Algunas reacciones que requieren una concentración inicial mayor fallan, porque la forma aldehídica no tiene concentración suficiente para que se produzca la reacción; no obstante los monosacáridos presentan una variedad de reacciones que se producen bien, las reacciones son las típicas de las funciones presentes, carbonilo e hidroxilo, incluyendo interacciones entre ambos grupos (Fessenden, 1998).

Reacciones del grupo carbonilo

- Oxidación.

Un monosacárido con el C₁ oxidado a carboxilo, recibe el nombre de ácido aldónico. La forma de obtenerlos se representa en las Figuras 6 y 7.

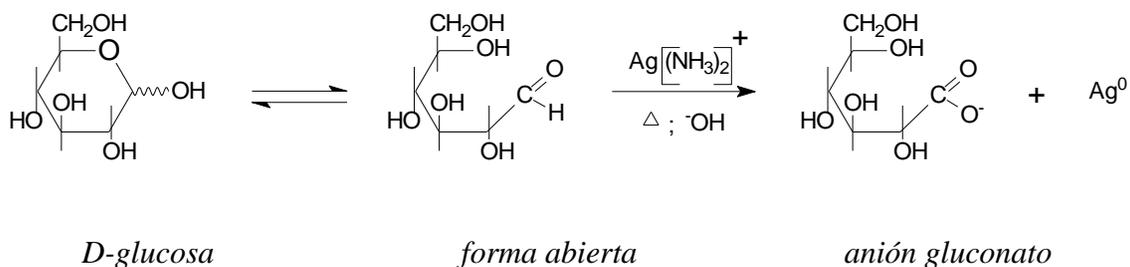


Figura 6: Formación de ácidos aldónicos de glucosa

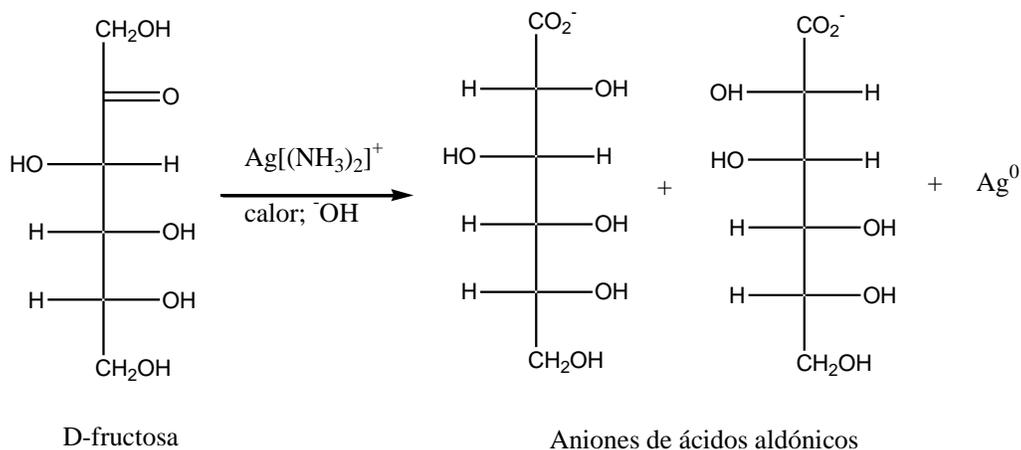


Figura 7: Formación de ácidos aldónicos de fructosa

Las aldosas reciben el nombre genérico de “azúcares reductores”, reducen oxidantes suaves como los reactivos de Fehling (Figura 8), Tollens (espejo de plata) (Figura 9), y Benedict (precipitado rojizo de Cu_2O). Todo esto se debe a la presencia de la estructura abierta en el equilibrio de la ciclación.

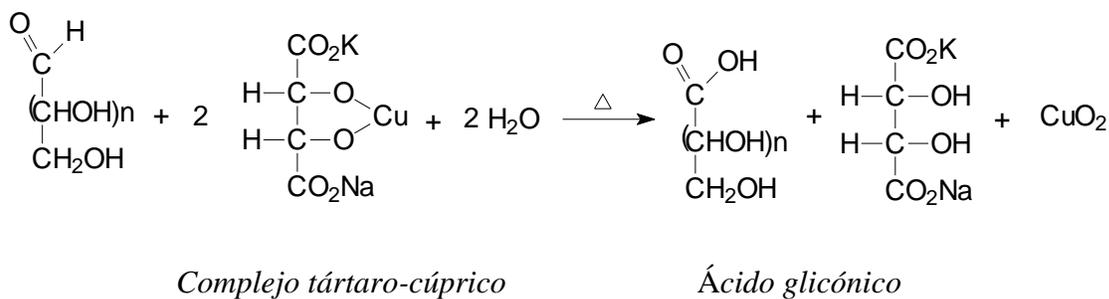


Figura 8: Reacción de Fehling

Los tres reactivos, Tollens, Fehling y Benedict, son básicos, por lo que las cetosas también los reducen, ya que en medio alcalino están en equilibrio con dos aldosas epiméricas a través de un enodiol intermediario (Solomons, 1997).

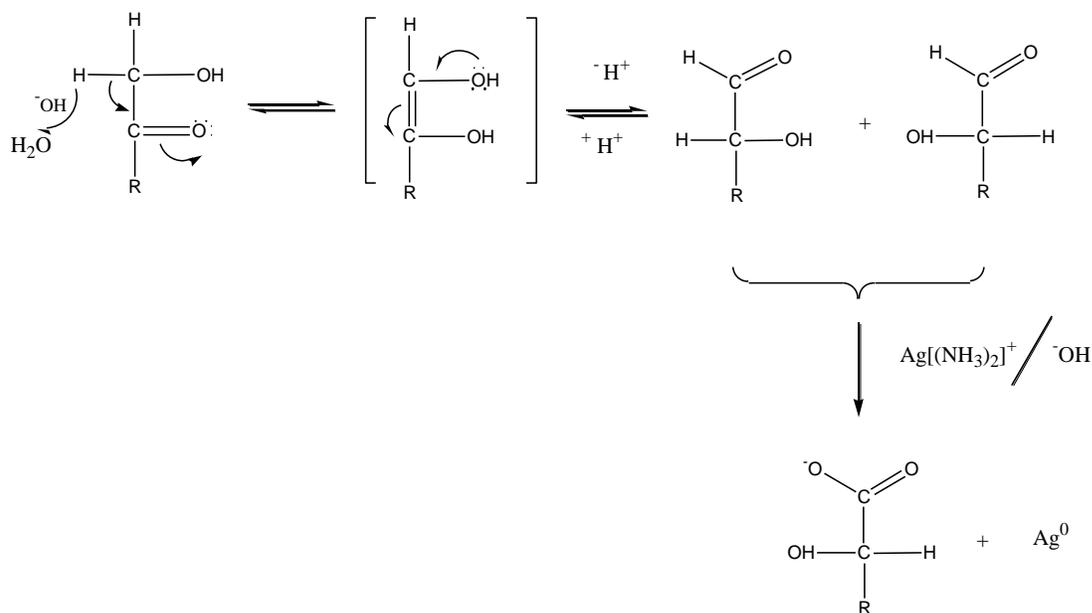


Figura 9: Reacción de Tollens

2.4. Fotoquímica

La fotoquímica es el estudio de las transformaciones químicas provocadas o catalizadas por la emisión o absorción de luz visible o radiación ultravioleta. Una molécula en su estado fundamental (no excitada) puede absorber un quantum de energía lumínica, esto produce una transición electrónica y la molécula pasa a un estado de mayor energía o estado excitado. Una molécula excitada es más reactiva que una molécula en su estado fundamental (Baird, 2001).

El fenómeno fotoquímico precisa de dos fases principales:

1. Recepción de la energía luminosa
2. Reacción química propiamente dicha.

Leyes fundamentales.

1. Ley de absorción de Grotthus-Draper: Una radiación no puede provocar acción química más que si es absorbida por un cuerpo (o un sistema de cuerpos); si no, no puede haber transmisión de energía luminosa.

2. Ley energética: Para que una radiación luminosa actúe eficazmente, debe poseer una energía, por lo menos, igual a la necesaria para la transformación química.

Las radiaciones poseen tanta más energía cuanto más cortas sean sus longitudes de onda (o más elevadas sean sus frecuencias). La energía transportada por un fotón viene dada por la expresión:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

donde h es la constante de Planck, igual a 6.626069×10^{-27} ergios.seg, y c es la velocidad de la luz.

Ley de la equivalencia fotoquímica (o ley de Einstein): A cada fotón absorbido, corresponde una molécula descompuesta o combinada.

2.5 Química Computacional

La química computacional se empezó a desarrollar en los años setenta del siglo XX como un nuevo campo del conocimiento orientado al diseño de moléculas asistido por computadora. Sin embargo, el alcance que ha logrado esta ciencia basada en la química teórica y aplicada en la química computacional, es más vasta ahora. Proporcionando un conjunto de núcleos y el número de electrones de cada molécula, se pueden calcular propiedades como:

- a) Los arreglos geométricos de los átomos que corresponden a moléculas estables y a estados de transición.
- b) Las energías relativas de varias moléculas.
- c) Sus propiedades: momento dipolar, polarizabilidad.
- d) Propiedades espectroscópicas, como corrimientos químicos y constantes de acoplamiento, frecuencias vibracionales, etc.
- e) Propiedades termoquímicas.
- f) La rapidez con la que un reactivo se transforma en producto (propiedades cinéticas).

g) El cambio de algunas propiedades, como la estructura molecular, con el tiempo (Cuevas y Cortés, 2003).

Estos métodos permiten determinar las propiedades electrónicas del estado de transición que conecta a un reactivo con un producto, evaluar el efecto que tienen los patrones de sustitución sobre su estabilidad y, con ello, eliminar especulaciones sobre posibles mecanismos de reacción (Cuevas y Cortés, 2003).

Para lograr establecer los mecanismos de reacción o resolver un problema químico a nivel teórico, de acuerdo con los postulados de la Mecánica Cuántica, es necesario conocer la función de onda Ψ , la cual permite calcular la energía y otras propiedades. Mediante los postulados, es posible plantear la ecuación exacta para obtener la energía y la función de onda de un sistema estacionario, que es la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$H \Psi = E \Psi$$

Donde H es el Hamiltoniano del sistema, es decir, el operador asociado a la energía (E) y Ψ la función de onda.

Los métodos empleados para ello cubren situaciones estáticas y dinámicas. En todos los casos, el tiempo de cálculo aumenta rápidamente a medida que el tamaño del sistema estudiado crece. Este sistema puede ser una simple molécula, un grupo de éstas o un cuerpo sólido. Estos métodos, por lo tanto, se basan en teorías que van desde la alta precisión, pero apropiados para pequeños sistemas, a las buenas aproximaciones, pero apropiadas para grandes sistemas. Los métodos más precisos son llamados **métodos *ab initio***, los cuales están basados totalmente en la teoría de los primeros principios. Los menos precisos son llamados empíricos o semi-empíricos, debido a que son obtenidos de resultados experimentales, a menudo de átomos o moléculas relacionadas y se usan en conjunto a la teoría (Smith y Sutcliffe, 1997).

El tipo más simple de cálculo de estructura electrónica *ab initio* es el método de Hartree-Fock (HF), una extensión de la teoría de orbitales moleculares, en la cual la energía de correlación electrónica debida a la repulsión electrón-electrón no es específicamente tomada en cuenta; sólo su efecto promedio es incluido en los cálculos. Como el tamaño de

las bases de conjunto es incrementado, la energía y la función de onda tienden a un límite llamado el límite Hartree-Fock (Smith y Sutcliffe, 1997).

Otro método es el de la teoría del funcional de la densidad (DFT, del inglés *Density Functional Theory*) que son a menudo considerados por los métodos ab initio para determinar la estructura electrónica molecular y las propiedades que le acompañan, incluso aunque muchos de los más comunes funcionales usen parámetros derivados de datos empíricos, o de los cálculos más complejos. Esto significa que deberían también ser llamados métodos semi-empíricos.

En DFT, la energía total es expresada en términos de la densidad total en lugar de la función de onda. En este tipo de cálculos, hay un Hamiltoniano aproximado y una expresión aproximada para la densidad electrónica total. Los métodos DFT pueden ser muy precisos bajo un pequeño costo computacional. Algunos funcionales híbridos muy empleados como el B3LYP involucran parámetros de ajuste como una partición de la energía de intercambio con la metodología Hartree Fock (Carvajal, 2004).

Generalmente, no importa la metodología seleccionada; el primer paso es realizar una optimización geométrica de las especies involucradas en el estudio a realizar y posteriormente un cálculo de frecuencias con el que es posible calcular magnitudes termodinámicas tales como correcciones a la energía por efecto de la temperatura ZPE y ΔE (thermal Corr), la entalpía (ΔH) y energía libre de Gibbs (ΔG). Para obtener estos valores se utiliza la función de partición molecular que no es más que la suma de los pesos estadísticos de los estados correspondientes a un conjunto dado y se expresa como:

$$q^* = \sum_i g_i e^{\frac{-\Delta \epsilon_i}{RT}}$$

Una corrección importante de incorporar a los resultados termoquímicos es la energía de punto cero (ZPE) que es una corrección a la energía electrónica de la molécula debido a efectos vibracionales que persisten a 0 K. Una información adicional que se obtiene con el cálculo de frecuencias es también si la geometría obtenida del proceso de optimización geométrica corresponde a la de mínima energía (todas deben ser de magnitud positivas) o si ésta está relacionada con algún estado de transición (frecuencia negativa o imaginarias).

Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN

La industria de alimentos y bebidas utiliza una gran cantidad de aditivos aprobados por las diferentes instancias gubernamentales. Su aplicación para mejorar aspectos organolépticos y de funcionalidad no está a discusión. Sin embargo las interacciones entre ellos o con elementos de la matriz de un producto, no están documentadas en su totalidad.

Tal es el caso observado a simple vista de un licor tipo Amaretto, el cual sufría pérdida de color a través del tiempo, hasta tornarse un color muy tenue.

Se determinó como un tema viable de investigación, donde se analizaría si era un problema característico del producto en cuestión y en cuánto tiempo y bajo qué condiciones se llevaba a cabo.

A partir de esta premisa se consiguieron marcas de licores Amaretto tanto nacionales como importados. A partir de ello se elaboró un método experimental que diera respuesta a estas primeras cuestiones.

Como toda matriz alimenticia, la mezcla de ingredientes puede provocar sinergia entre ellos o bien disminuir capacidades de los ingredientes usados, además de reacciones secundarias indeseables. Es por esto que se desdobló dicha matriz tratando de buscar entre las relaciones de los ingredientes, la causa del problema de decoloración del licor tipo Amaretto.

Capítulo 4. HIPÓTESIS

El problema de la decoloración del Amaretto se puede entender (o resolver) a partir de la composición especial del Amaretto problema, considerando los edulcorantes, colorantes y otros componentes.

Capítulo 5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Identificar y evaluar los procesos que causan la decoloración del licor de almendras tipo Amaretto.

5.2. Objetivos Específicos

- 1.- Caracterizar las muestras del licor de Amaretto: pH, °Brix, % de alcohol en volumen (densidad), absorbancia inicial.
- 2.- Determinar los compuestos que intervienen en la impartición del color del Amaretto, así como otros componentes del licor (edulcorantes y saborizantes).
- 3.- Realizar pruebas cuantitativas de la fotodegradación del color del licor.
- 4.- Realizar pruebas de fotodegradación de color de los colorantes encontrados en las muestras, por separado en condiciones controladas de iluminación, temperatura y tiempo.
- 5.- Correlacionar las composiciones de las diversas marcas de Amarettos con su comportamiento diferencial en cuanto a su decoloración.

Capítulo 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1. Equipo

Los equipos que se usaron en esta investigación fueron:

Medidor multiparámetro de mesa. HORIBA. Modelo F-51, con electrodo de vidrio.

Refractómetro Abbé de mesa. ATAGO. Modelo NAR-1T.

Espectrofotómetro UV-Visible. Perkin Elmer, Modelo Lambda 25.

HPLC. Marca Agilent Modelo 1100, usando una columna de rápida resolución Zorbax Eclipse XDB-C18 (3 μ tamaño de partícula; 4.6 x 150 mm) (para colorantes) y una columna Aminex HPX-87P (7.8 x 300 mm) de Bio-Rad (para azúcares).

Cámara de irradiación de 0.60 m x 0.30 m x 0.40 m.

Lámpara de halógeno MR16/50W/C-130V, Marca Tecno Lite.

Radiómetro piroeléctrico. Marca Laser Probe, Modelo RSP-590.

Software Químico: Gaussian 09 para plataforma Linux, que corre en 8 procesadores en paralelo a través del servidor de la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa) vía remota. Los cálculos son realizados de manera simultánea y sucesiva con los requerimientos necesarios para poder ejecutar el programa, como son memoria (2GB) por proceso por cálculo.

6.1.2. Materia prima

Una de las primeras acciones fue escoger algunos tipos de Amarettos disponibles en México, los cuales fueron 4 marcas.

Éstos se codificaron para preservar la identidad del licor problema, asignándose las letras A, B, C y D aleatoriamente. El licor A es la marca problema.

Se obtuvieron muestras preparadas con diferentes formulaciones de la empresa proveedora de la muestra problema, las cuales contienen: 1) Fructosa 42 (12%, p/v) como edulcorante, 2) una formulación alternativa con sacarosa (14%, p/v) en lugar de Fructosa 42 y 3) una formulación sin adición de edulcorante. Todas estas formulaciones contienen maltodextrina (3%, p/v) como agente espesante, Tartrazina a 9.8 mg/L, y Allura Red a 3.85 mg/L, así como alcohol etílico (28%, v/v).

6.1.3. Reactivos

Acetato de etilo, acetona, agua grado HPLC, agua bidestilada, anilina, 1-butanol, cloroformo, diclorometano, difenilamina, etanol, metanol y 1-propanol, todos de grado reactivo, fueron adquiridos de J.T.Baker.

Solución de hidróxido de sodio (NaOH 6 N), metanol grado HPLC, ácido trifluoroacético, trietilamina, estándares de pH 4 y 7 fueron productos de Sigma-Aldrich.

Alcohol potable (96%) se obtuvo de Licores Típicos Mexicanos.

Allura Red (pureza 80%) y Tartrazina (pureza 99%) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y Fluka Analytical, respectivamente,

6.2. Métodos

6.2.1. Físicoquímicos

6.2.1.1. Determinación del porcentaje de alcohol en volumen a 20°C

Conforme a la NOM 142 de la SSA1-1995.

La muestra se mide y se vierte en un matraz volumétrico, 250 mL (recomendado para licores) de muestra a una temperatura de 20°C (293 K) \pm 0.5°C, transferirlos cuantitativamente con 100 mL de agua destilada.

Calentar el matraz de destilación y recibir el destilado en el mismo matraz donde se midió la muestra. El matraz de recepción debe encontrarse sumergido en un baño de agua-hielo durante el curso de la destilación.

Colocar la muestra en una probeta adecuada al tamaño del alcoholímetro y a la cantidad de la muestra destilada. El alcoholímetro debe flotar libremente, se aconseja que esté separado

de las paredes de la probeta ± 0.5 cm. Esperar a que se establezca la temperatura y dando ligeros movimientos con el termómetro, eliminar las burbujas de aire. Efectuar la lectura de ambos que debe de ser de 20°C en caso contrario, ajustar con las tablas de corrección.

6.2.1.2. Medición de pH

Se calibró con soluciones buffer pH 4 y 7 a temperatura ambiente, según manual de HORIBA.

6.2.1.3. Medición de •Brix e índice de refracción

La medición de grados Brix se realizó conforme al manual de uso de equipo Abbé modelo T 100. El método establece una medición rápida pero limitada para edulcorantes únicos y conocidos. Se lleva a cabo como primera aproximación en el establecimiento de diferencias entre las marcas de licores seleccionadas. El índice de refracción establece posibles diferencias en la composición de azúcares.

6.2.2. Cromatografía en capa fina

6.2.2.1. Edulcorantes

El análisis de los diferentes licores Amaretto por cromatografía en capa fina se llevó a cabo siguiendo el método de Žilić y col. (1979). La fase estacionaria, placa fina de sílice soportada en lámina de aluminio (Merck 5553), se usó en tiras de 20 cm de largo. La fase móvil fue acetona-cloroformo-agua (85:10:5, v/v). Las soluciones muestra de los Amarettos fueron diluciones al 10% (v/v) en agua, aplicadas a la placa cromatográfica en volumen de 1.5 μ L. En la misma placa también se aplicaron muestras estándar de diferentes sacáridos.

La cromatografía se realizó en forma ascendente, en una cámara de vidrio saturada con los vapores de la fase móvil, en forma de dos desarrollos consecutivos, cada uno de ellos con una carrera del frente de la fase móvil de 16.0 cm. Después de cada desarrollo la placa cromatográfica se secó por 2 minutos a 110°C. La placa se asperjó con la solución de detección (1.0 g de difenilamina, 1.0 g de anilina, 20 mL de acetona, 7.5 mL de H₃PO₄ al 85%) y se calentó por 20 minutos a 110°C. Las manchas cromatográficas coloridas

visualizadas de esta manera se evaluaron en cuanto a su desplazamiento desde el origen y su color.

6.2.2.2. Colorantes

Se desarrolló la cromatografía en capa fina para determinar cualitativamente la presencia de colorantes azoicos en el licor tipo Amaretto. Se decidió probar varias combinaciones de solventes o solventes puros, sabiendo de antemano que los resultados podrían ser limitados por la presencia de diferentes colorantes que podrían interferirse entre sí para poder lograr su identificación (Gerasimov, 2000).

Fue usada la muestra problema A, sin dilución, con una fase estacionaria de sílica gel. El volumen aplicado a la tira de 10 cm x 2 cm de ancho, fue de 10 μ L a una distancia de 1.2 cm de la base.

Se probaron las siguientes fases móviles: metanol, etanol, ácido acético, y acetona.

El eluyente se colocó en probetas de 50 mL, hasta un nivel debajo de la posición inicial de las muestras (Egan, 1988).

6.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución

6.2.3.1. Edulcorantes

Los azúcares contenidos en las muestras de Amarettos, fueron evaluados de acuerdo al método de Lenherr y col. (1987) por HPLC con una columna Aminex HPX-87P, usando elución isocrática con agua grado HPLC, a 80°C y con un flujo de 0.6 mL/min, monitoreando por índice de refracción. Las muestras de las formulaciones de Amaretto fueron preparadas a una dilución al 20% (v/v) en agua grado HPLC y el volumen de inyección fue de 20 μ L.

6.2.3.2. Colorantes

El análisis de colorantes por cromatografía de líquidos se utilizó para separar los colorantes azoicos, siguiendo el método de Ricker (2002). Este método fue desarrollado en un HPLC marca Agilent 1100, usando una columna de rápida resolución Zorbax Eclipse XDB-C18. La elución se realizó a 25°C con un gradiente binario lineal (de 17% a 100% de solvente

B/12 minutos) formado de solventes A y B, donde A fue 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético en agua grado HPLC, ajustado a pH de 4.4 con trietilamina, y B fue metanol grado HPLC. La tasa de flujo fue 1 mL/min, y la elución fue monitoreada midiendo la absorbancia a 428 nm y 502 nm, las cuales son las longitudes de onda de las máximas absorbancias de la Tartrazina y del Allura Red, respectivamente. Los volúmenes inyectados de las muestras fueron de 20 μ L. Las muestras de Amaretto fueron diluidas al 10% (v/v) con las diferentes formulaciones de Amaretto en agua grado HPLC. Allura Red y Tartrazina fueron usados para el análisis de HPLC en solución acuosa a concentraciones de 0.38 mg/L y 0.98 mg/L, respectivamente.

6.2.4. Cinética de decoloración

Los experimentos de cinética de decoloración fueron realizados con volúmenes de 3 mL de muestra, en cubetas de cuarzo de 4 mL, con 1 cm de paso de luz, herméticamente cerradas. La irradiación de estas muestras fue realizada en una cámara especial, cuya superficie interior estaba pintada de negro (Figura 10). El suministro de luz fue con una lámpara de halógeno colocada a una distancia de 15, 20, o 30 cm de las muestras, correspondiendo a flujos de 841, 652 y 290 W/m^2 respectivamente, determinados con un radiómetro piroeléctrico. Los tiempos de irradiación fueron 0, 6, 12, 24, 48, 96, 192 y 360 h. Las muestras irradiadas fueron las formulaciones preparadas con Fructosa 42, con sacarosa o sin edulcorante. Todas las muestras se colocaron en la cámara de irradiación como se muestra en la Figura 10. Se determinó la temperatura dentro de la cámara de irradiación y de las muestras irradiadas, siendo la más alta de 2 grados centígrados por arriba de la temperatura ambiente. Puesto que el lugar era fresco, la temperatura máxima de las muestras fue de 27°C a 841 W/m^2 .

Después de los diferentes tiempos de irradiación, se obtuvo el espectro de absorción entre 350 y 900 nm, contra un blanco de agua. También se removieron alícuotas de 30 μ L a esos tiempos para análisis en HPLC.

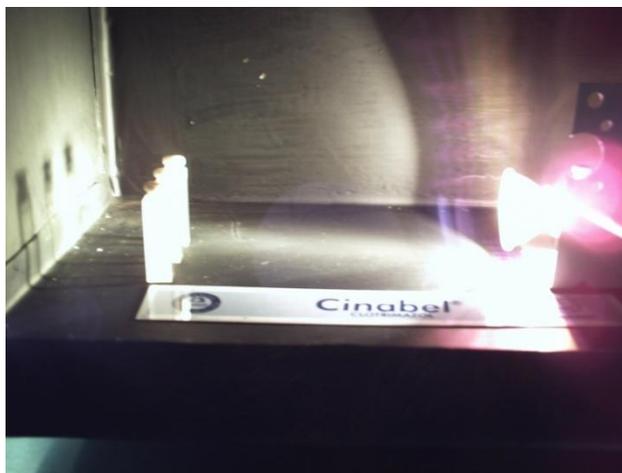


Figura 10: Cámara de irradiación

6.2.5. Química Computacional.

La realización de los cálculos químico-cuánticos en el presente trabajo consideró cinco etapas concretas que, de manera simple, se pueden mencionar como a continuación: a) Delimitación del problema, b) Generación de archivos de entrada, c) Envío de los cálculos, d) Análisis de los archivos de salida, e) Resultados finales.

a) Delimitación del problema. La tartrazina fue seleccionada como molécula modelo del estudio en cuestión y de ésta se consideraron sus dos isómeros (cis y trans-tartrazina). El otro reactivo fue la fructuosa que también fue considerada como isómeros cis y trans. Inicialmente se optimizaron las geometrías y se estableció la geometría más probable para todas las moléculas utilizando el método semi-empírico PM6. Así mismo los productos, dicetona y tartrazina reducida son también calculados y optimizados. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el Gaussian 09 y el objetivo principal fue ver la estructura más estable desde un punto de vista energético y si correspondía a geometrías mínimas o involucraba otro estado.

b) Generación de archivos de entrada. Utilizando Gaussview, interface gráfica de Gaussian, se construye la molécula. Estas geometrías son preliminares. Estos archivos son nombrados con extensiones ***.com** para que sean reconocidos en plataforma LINUX, ya que

el cálculo se realizó en el clúster mencionado utilizando 8 procesadores por molécula y por optimización geométrica, además del cálculo de las frecuencias.

c) Envío de los cálculos. En esta etapa se requiere hacer un enlace remoto al centro de cómputo en donde se ejecuta el programa para lo cual se requiere una instrucción. El enlace requiere abrir una cuenta en donde se proporciona Username y Password. Esto solamente es posible cuando se hace una petición por la institución ejecutante y hacia el centro de administración (UAM-Iztapalapa, AITZALOA que es el nombre la supercomputadora). Los cálculos enviados fueron de optimización geométrica y de frecuencias. Las instrucciones en el comando de ejecución son opt y freq.

d) Análisis de los archivos de salida.

Fragmento de cálculo de optimización geométrica del salida del programa Gaussian. El criterio en este proceso de optimización se ve en la columna que dice Threshold y la convergencia en el Converged? El cual en al menos dos de ellos debe escribir la palabra “YES”.

```

D88      2.09433   0.00000   0.00000  -0.00051  -0.00051   2.09382
D89      3.13912   0.00000   0.00000  -0.00043  -0.00043   3.13869
D90      1.04192   0.00000   0.00000  -0.00044  -0.00044   1.04148
D91     -1.04698   0.00000   0.00000  -0.00044  -0.00044  -1.04742
      Item                Value      Threshold  Converged?
Maximum Force             0.000017    0.000450    YES
RMS      Force             0.000002    0.000300    YES
Maximum Displacement      0.001161    0.001800    YES
RMS      Displacement      0.000189    0.001200    YES
Predicted change in Energy=-2.458177D-09
Optimization completed.
  -- Stationary point found.

                        -----
                        !   Optimized Parameters   !
                        ! (Angstroms and Degrees)  !
                        -----
! Name  Definition                Value      Derivative Info.      !
-----
! R1    R(1,2)                    1.289      -DE/DX = 0.0          !
! R2    R(1,27)                   1.4122     -DE/DX = 0.0          !
! R3    R(2,3)                    1.3623     -DE/DX = 0.0          !
! R4    R(3,4)                    1.4422     -DE/DX = 0.0          !
! R5    R(3,5)                    1.413      -DE/DX = 0.0          !
! R6    R(4,7)                    1.3192     -DE/DX = 0.0          !
! R7    R(4,10)                   1.5409     -DE/DX = 0.0          !
! R8    R(5,6)                    1.348      -DE/DX = 0.0          !

```

Fragmento de cálculo vibracional y de Termoquímica con el programa Gaussian 09.

```

Harmonic frequencies (cm**-1), IR intensities (KM/Mole),
Raman scattering activities (A**4/AMU), Raman depolarization ratios,
reduced masses (AMU), force constants (mDyne/A) and normal coordinates:
      1           2           3
      A'         A'         A'
Frequencies -- 1602.8186      3816.4535      3921.7160
Red. masses  --  1.0829      1.0449      1.0824
Frc consts   --  1.6391      8.9674      9.8083
IR Inten     --  66.7805      9.2880      56.6789
Raman Activ  --  0.0000      0.0000      0.0000
Depolar      --  0.0000      0.0000      0.0000
Atom AN      X         Y         Z         X         Y         Z         X         Y         Z
  1   8      0.00      0.07      0.00      0.00      0.05      0.00      0.07      0.00      0.00
  2   1     -0.43     -0.56      0.00      0.59     -0.40      0.00     -0.56     0.43      0.00
  3   1      0.43     -0.56      0.00     -0.58     -0.39      0.00     -0.56    -0.43      0.00

-----
- Thermochemistry -
-----
Temperature 298.150 Kelvin. Pressure 1.00000 Atm.
Atom 1 has atomic number 8 and mass 15.99491
Atom 2 has atomic number 1 and mass 1.00783
Atom 3 has atomic number 1 and mass 1.00783
Molecular mass: 18.01056 amu.
Principal axes and moments of inertia in atomic units:
      1           2           3
EIGENVALUES --  2.19005      4.19706      6.38712
X              1.00000      0.00013      0.00000
Y             -0.00013      1.00000      0.00000
Z              0.00000      0.00000      1.00000
THIS MOLECULE IS AN ASYMMETRIC TOP.
ROTATIONAL SYMMETRY NUMBER 1.
ROTATIONAL TEMPERATURES (KELVIN)      39.54856      20.63666      13.56064
ROTATIONAL CONSTANTS (GHZ)            824.06297      430.00078      282.55957
Zero-point vibrational energy          55871.5 (Joules/Mol)
                                       13.35361 (Kcal/Mol)
VIBRATIONAL TEMPERATURES: 2306.09 5490.99 5642.44
(KELVIN)

Zero-point correction= 0.021280 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy= 0.024116
Thermal correction to Enthalpy= 0.025060
Thermal correction to Gibbs Free Energy= 0.002983
Sum of electronic and zero-point Energies= -76.437250
Sum of electronic and thermal Energies= -76.434415
Sum of electronic and thermal Enthalpies= -76.433471
Sum of electronic and thermal Free Energies= -76.455548
    
```

ZPE
ΔE (thermal Corr)
ΔH (entalpia)
ΔG (Gibbs)

	E (Thermal) KCAL/MOL	CV CAL/MOL-KELVIN	S CAL/MOL-KELVIN
TOTAL	15.133	6.014	46.466
ELECTRONIC	0.000	0.000	0.000
TRANSLATIONAL	0.889	2.981	34.609
ROTATIONAL	0.889	2.981	11.850
VIBRATIONAL	13.356	0.052	0.008
	Q	LOG10(Q)	LN(Q)
TOTAL BOT	0.424554D-01	-1.372067	-3.159301
TOTAL V=0	0.260701D+09	8.416143	19.378886
VIB (BOT)	0.162922D-09	-9.788020	-22.537749
VIB (V=0)	0.100044D+01	0.000190	0.000438
ELECTRONIC	0.100000D+01	0.000000	0.000000
TRANSLATIONAL	0.300436D+07	6.477751	14.915574
ROTATIONAL	0.867365D+02	1.938202	4.462875

e) Resultados finales

Una vez que se realiza el análisis de resultados, se generan tablas y figuras y se discute, sobre la base de las energías y sus diferencias, la viabilidad de la propuesta.

Capítulo 7. RESULTADOS

7.1. Caracterización fisicoquímica de diferentes marcas de licor tipo Amaretto

Las primeras mediciones fueron realizadas para tres marcas diferentes:

Tabla 4: Caracterización fisicoquímica de 3 marcas de licor tipo Amaretto

Parámetros	Marca A	Marca B	Marca C
% alcohol en volumen	28.2	26.4	28.2
pH	4.8	6.1	4.9
°Brix	37.0	33.9	37.0
Índice de refracción	1.3943	1.3880	1.3943

Los resultados fueron coincidentes para dos marcas (A y C), mientras que la marca B muestra valores que indican una composición diferente. Los grados Brix e índice de refracción no sólo reflejan la cantidad de edulcorante presente, ya que al contener los Amarettos un porcentaje importante de alcohol, éste afecta en medida sustancial al índice de refracción, por lo que este parámetro no proporciona lecturas que caractericen de manera directa la cantidad de edulcorante presente.

7.2. Caracterización de colorantes contenidos en los diferentes licores

7.2.1 Caracterización de colorantes por cromatografía en capa fina

Inicialmente se exploró la cromatografía en capa fina de sílice para analizar los colorantes contenidos en las diferentes marcas de Amaretto, con acetato de etilo como fase móvil, aplicando las muestras del licor directamente, en alícuotas de 10 µL. El cromatograma obtenido no mostró ninguna banda cromatográfica colorida, pero sí una extensa mancha blanca alrededor del punto de origen de la cromatografía, indicativa de los edulcorantes. Con metanol como fase móvil, los colorantes migraron con el frente del solvente, sin lograrse un efecto cromatográfico.

Los mejores resultados con este tipo de cromatografía se lograron en capa fina de sílice, con metanol como fase móvil, pero con muestras puras de colorante, donde se observó un

mejor desplazamiento, con valores de $R_f = 0.00$ para Tartrazina y $R_f \approx 0.1$ para Allura Red. En cambio, el cromatograma de la marca A, evidenció la interferencia de la alta concentración de edulcorante en la muestra (alrededor de 14%, p/v), que desplaza a la zona cromatográfica del colorante, dándole el típico aspecto de cabeza de flecha. Por esta razón se consideró buscar una manera de separar, en estas muestras, los edulcorantes de los colorantes, para facilitar el análisis de estos últimos por cromatografía en capa fina. Para este fin se ensayaron varios sistemas bifásicos de extracción, con una fase acuosa y la otra constituida primordialmente por un líquido semipolar, inmisible con agua. Para esto se probaron el 1-propanol, el 1-butanol, y el cloroformo. Se consideraba la posibilidad de que los edulcorantes se acumularan en la fase acuosa, mientras que los colorantes se disolvieran en la fase orgánica, que luego sería concentrada bajo vacío y finalmente aplicada a la capa fina para su análisis cromatográfico. De los tres solventes orgánicos ensayados, el 1-propanol mostró el mejor desempeño, lográndose una captura parcial de los colorantes Allura Red y color de caramelo en la fase orgánica, pero esto no se dio en el caso de la Tartrazina (Figura 11). En todo caso, con el sistema 1-propanol/agua la mayor parte de los colorantes se acumuló en la fase acuosa (la fase inferior), junto con los edulcorantes. Los solventes orgánicos menos polares (1-butanol y cloroformo) mostraron un menor desempeño en estas pruebas de extracción, por lo que se decidió abandonar este abordamiento para el análisis de los colorantes.



Figura 11: Extracción líquido-líquido con 1-propanol:agua. De izquierda a derecha: Tartrazina, Allura Red y color caramelo.

7.2.2 Caracterización de colorantes por espectrofotometría UV-Visible

Varios colorantes azoicos se examinaron en cuanto a su espectro de absorción UV-Visible en solución acuosa. En un principio no se tenía información de los colorantes empleados en el licor problema, así que se analizaron muestras de los colorantes permitidos en la normatividad mexicana y que podrían usarse en estos tipos de licores, dado su perfil de color. En la Figura 12 se muestran los espectros de estos colorantes, en solución acuosa a 0.04 mg/L. Estos espectros muestran máximos de absorbancia a 428 nm (en el caso de Tartrazina), 490 nm (Sunset Yellow), 512 nm (Allura Red) y 515 nm (Ponceau 2R).

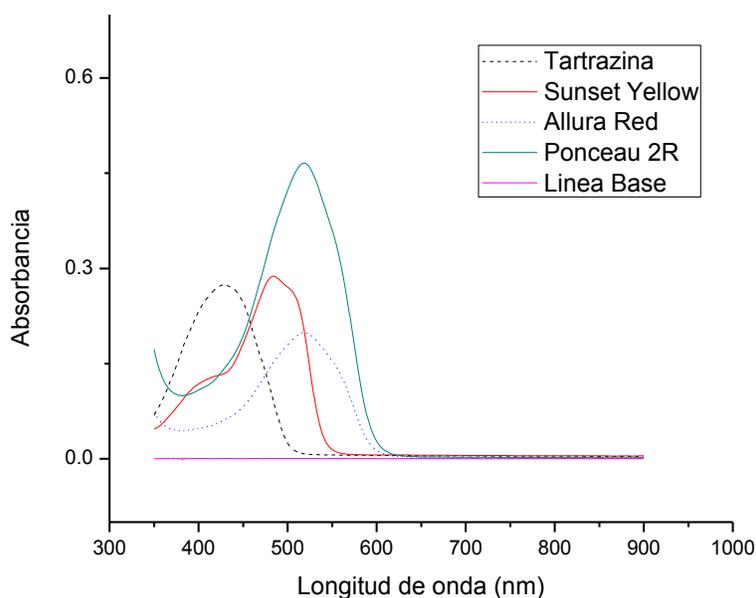


Figura 12: Espectros de absorción de diferentes colorantes

La Figura 13 presenta los espectros de absorción en la región visible para 3 marcas de Amaretto, registrados sin dilución en cubetas de 1 cm de paso, con agua como referencia. El espectro para la muestra del licor A presenta dos hombros, centrados alrededor de 428 nm y 502 nm, lo que propone la presencia de dos colorantes principales. En cambio, las marcas B y C muestran una absorción que aumenta de manera aproximadamente exponencial desde 900 nm hasta 350 nm, lo que posiblemente refleja la presencia de un

número mayor de colorantes, con absorbancia máxima en la región del UV de longitud larga, que extienden su absorción hasta la región visible.

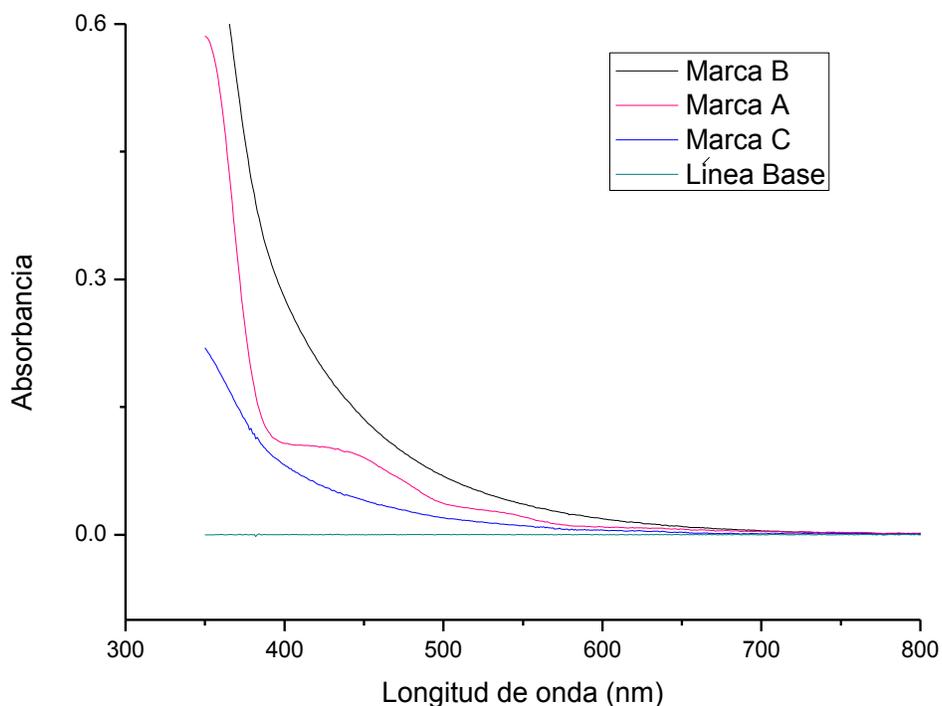


Figura 13: Espectros de absorción de diferentes marcas de licores

Las mediciones de espectroscopía de UV-Visible se llevaron a cabo contra un blanco de agua y una mezcla alcohol-agua (28%, v/v). Como se observa en los espectros, el perfil de etanol-agua *vs* agua muestra una caída de la línea base en la región del ultravioleta, sin embargo se decidió usar agua como material de referencia en este trabajo, ya que la región que nos interesaba era arriba de 350 nm.

En la Figura 14 se observa la línea base de agua *vs* agua, monitoreada durante 15 días y apreciando que no hay diferencia en el instrumento. De la misma manera se observa en la Figura 15 una prueba similar en la que la línea base usada es una mezcla etanol-agua al 28% (v/v) *vs* agua y es por eso que se da una caída con valores negativos en la región del ultravioleta. Este comportamiento se observó en las primeras mediciones de licores y por

eso se determinó finalmente usar la línea base de agua pero sólo considerando la región visible.

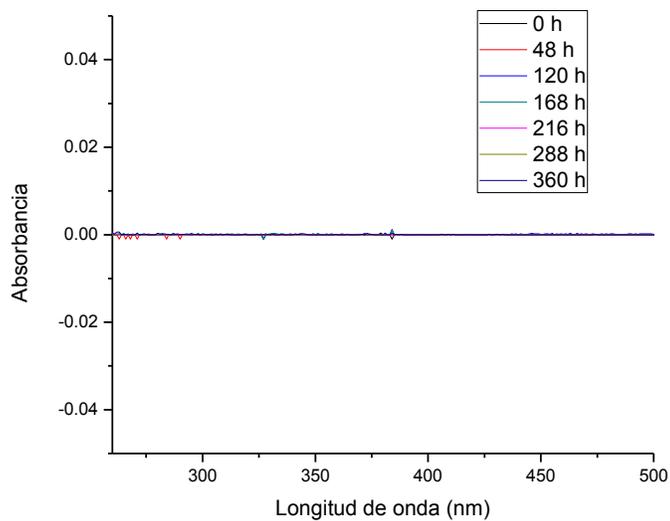


Figura 14: Línea base, agua vs agua

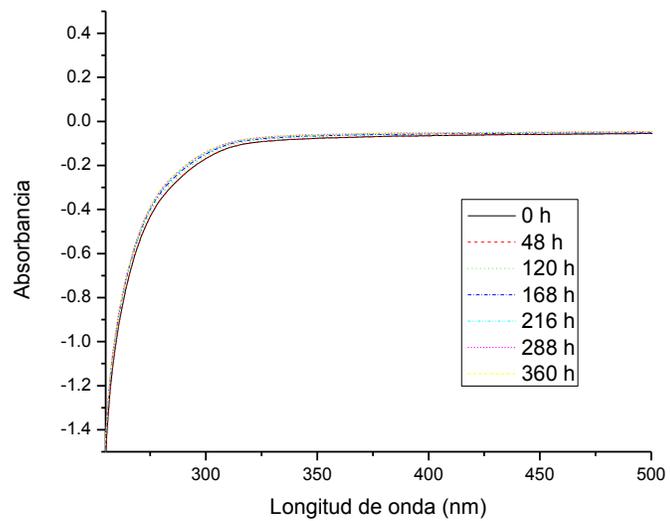


Figura 15: Línea base, etanol-agua (28%, v/v) vs agua

7.2.3 Caracterización de colorantes por HPLC

Para poder identificar las muestras de colorantes se analizaron los estándares de Tartrazina y Allura Red a concentraciones de 0.98 mg/L y 0.38 mg/L respectivamente, identificándose los tiempos de retención en las condiciones referidas, de 4.43 min para la Tartrazina (Figura 16) y de 7.35 min para el Allura Red (Figura 17).

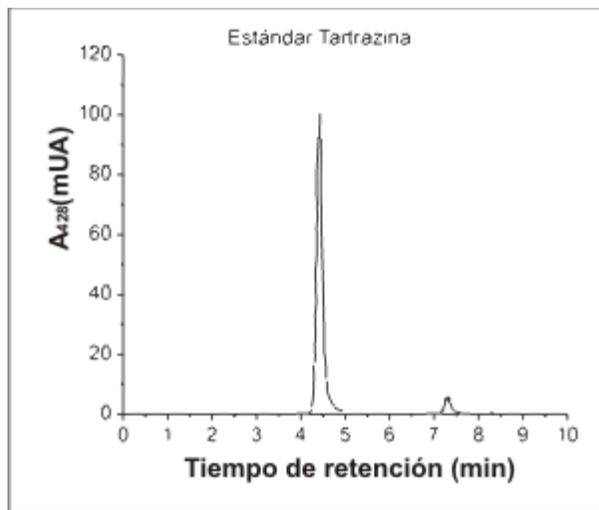


Figura 16: Perfil cromatográfico en HPLC del estándar de Tartrazina

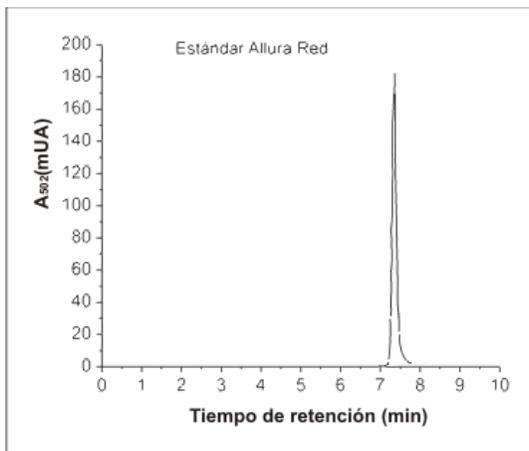


Figura 17: Perfil cromatográfico en HPLC del estándar de Allura Red

7.3. Caracterización de edulcorantes contenidos en los diferentes licores

7.3.1 Edulcorantes por cromatografía en capa fina de sílice

La cromatografía en capa fina de sílice mostró el desplazamiento y los colores desarrollados para los diferentes tipos de edulcorantes presentes en las marcas de licores, tras dos desarrollos seguidos, con la misma fase móvil. Se analizaron las 4 marcas, encontrándose los siguientes resultados.

Marca A: 0.6 cm (muy tenue); 1.5 cm (muy tenue); 3.9 cm (azul grisáceo); 4.9 cm (anaranjado)

Marca B: 2.0 cm (gris-marrón)

Marca C: 0.6 cm (muy tenue); 1.5 cm (muy tenue); 2.15 cm (marrón); 3.95 cm (mancha tenue, grisácea); 5.0 cm (mancha tenue)

Marca D: 2.1 cm (marrón)

Para los sacáridos estándar se obtuvo:

Sacarosa: 2.2 cm (gris-marrón)

Glucosa: 4.0 cm (azul grisáceo)

Arabinosa: 6.35 cm (gris)

Xilosa: 8.2 cm (gris azulado)

De la distancia de migración de cada mancha luego de los dos desarrollos cromatográficos se calculó el R_f correspondiente mediante la ecuación:

$$R_f = 1 - [1 - (d/l)]^{1/2}$$

Donde d es la distancia de migración total (después de los dos desarrollos consecutivos) de la mancha de interés, y l es la carrera del frente de solvente en cada desarrollo (16.0 cm en nuestro caso).

El listado de valores de R_f para estas cromatografías, junto con el color que muestran las manchas cromatográficas, se da a seguir:

Marca A: $R_f = 0.02$ (muy tenue); $R_f = 0.05$ (muy tenue); $R_f = 0.13$ (azul grisáceo); $R_f = 0.17$ (anaranjado)

Marca B: $R_f = 0.06$ (gris-marrón)

Marca C: $R_f = 0.02$ (muy tenue); $R_f = 0.05$ (muy tenue); $R_f = 0.07$ (marrón); $R_f = 0.13$ (mancha tenue, grisácea); $R_f = 0.17$ (mancha tenue)

Marca D: $R_f = 0.07$ (marrón)

Para los sacáridos estándar se obtuvo:

Sacarosa: $R_f = 0.07$ (gris-marrón)

Glucosa: $R_f = 0.13$ (azul grisáceo)

Arabinosa: $R_f = 0.22$ (gris)

Xilosa: $R_f = 0.30$ (gris azulado)

Para comparación, del trabajo de Žilić y col. (1979) realizado con el mismo sistema se obtienen los siguientes datos:

Sacarosa: $R_f = 0.062$ (gris-violeta)

Glucosa: $R_f = 0.117$ (azul)

Fructosa: $R_f = 0.146$ (naranja-rojo)

Arabinosa: $R_f = 0.200$ (azul)

Xilosa: $R_f = 0.279$ (azul)

Estos resultados cromatográficos indican que los edulcorantes principales en el Amaretto A son glucosa y fructosa, mientras que los productos B, C y D no contienen cantidades significativas de estos sacáridos, teniendo como su edulcorante principal a la sacarosa. El Amaretto C contiene principalmente sacarosa, y además pequeñas cantidades de glucosa y fructosa.

7.3.2 Edulcorantes por HPLC

La Figura 18 presenta los cromatogramas en HPLC de diferentes marcas de Amaretto, con seguimiento por índice de refracción. Los cromatogramas marcan diferencias significativas, indicando diferentes tipos de edulcorantes usados en la elaboración de los diferentes Amarettos. La muestra A es la que se aprecia con más diferencia, con respecto a las demás, por carecer del material con tiempo de elución de 10.2 minutos (tal como se aprecia en los Amarettos B y C) y tener materiales adicionales eluyendo a 12.2 minutos y 17.5 minutos.

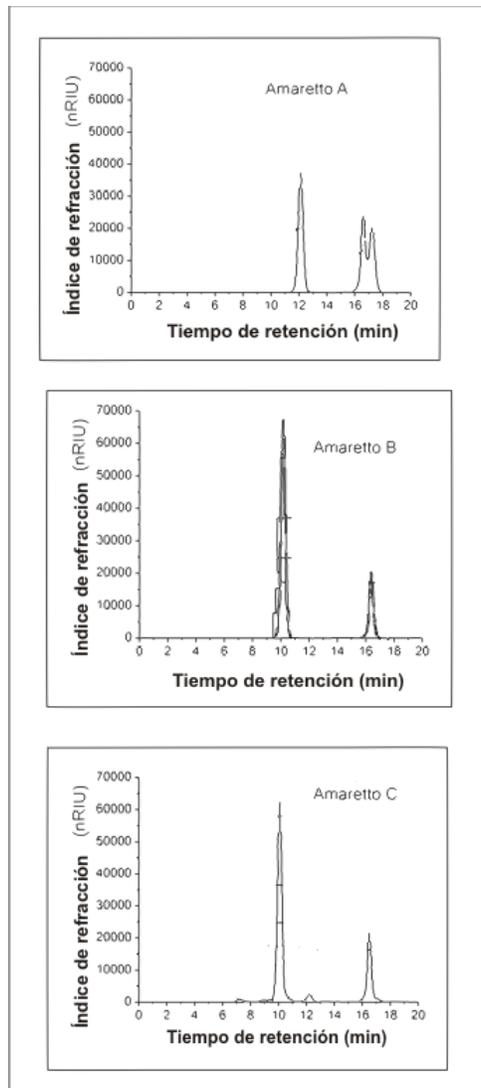


Figura 18: Perfiles cromatográficos en HPLC de edulcorantes en marcas A, B y C de Amarettos

Preparación de estándares de edulcorantes para HPLC

Para confirmar los edulcorantes utilizados en las formulaciones de los licores analizados, se ensayaron por HPLC estándares de sacarosa y de Fructosa 42, a tres diferentes concentraciones. La Figura 19 muestra los trazos cromatográficos obtenidos con sacarosa a concentraciones de inyección de 0.25% (p/v), 0.5 % y 1%.

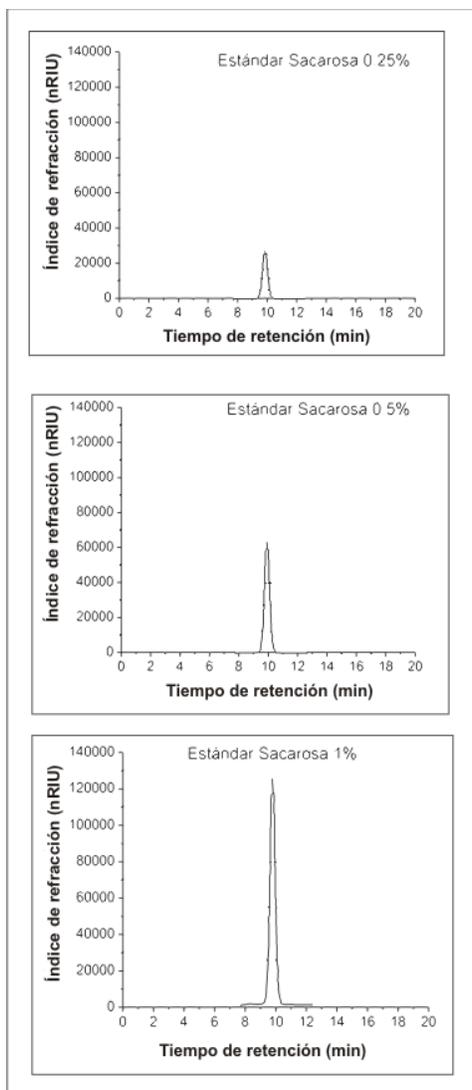


Figura 19: Perfiles cromatográficos en HPLC de estándares de sacarosa

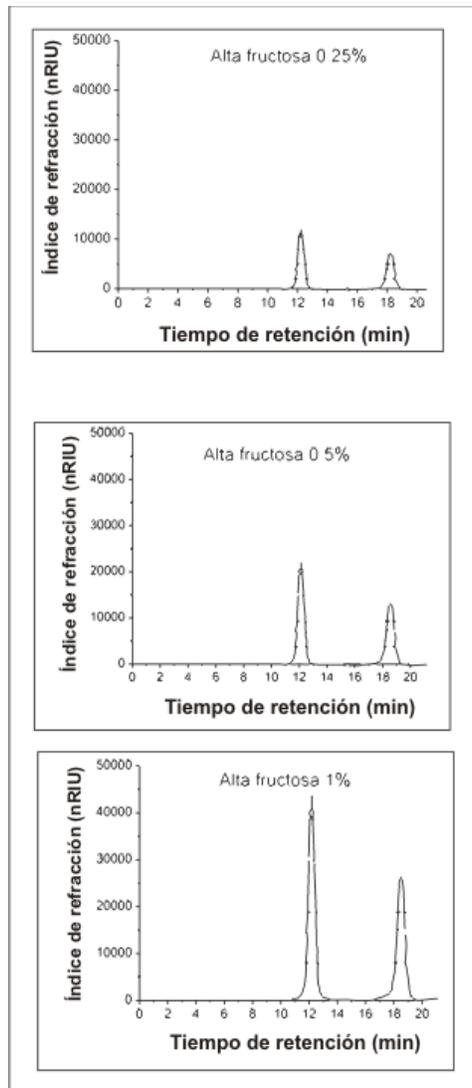


Figura 20: Perfiles cromatográficos en HPLC de estándares de Fructosa 42

La Figura 20 presenta los perfiles cromatográficos obtenidos con Fructosa 42 a concentraciones de inyección de 0.25% (p/v), 0.5% y 1%.

7.4. Cinética de decoloración

Las mencionadas formulaciones alternativas de licor de tipo Amaretto provistas por la compañía, se analizaron por espectrofotometría, inmediatamente después de su recepción y se fueron monitoreando mensualmente hasta 6 meses de almacenamiento en oscuridad y a 25°C (Figura 21). Los resultados fueron similares para las formulaciones con Fructosa 42, con sacarosa y sin edulcorante adicionado. En todos los casos, los espectros a tiempo cero y después de 6 meses son prácticamente superponibles, indicando que independientemente del edulcorante empleado, ninguna de las formulaciones sufrió decoloración significativa bajo estas condiciones.

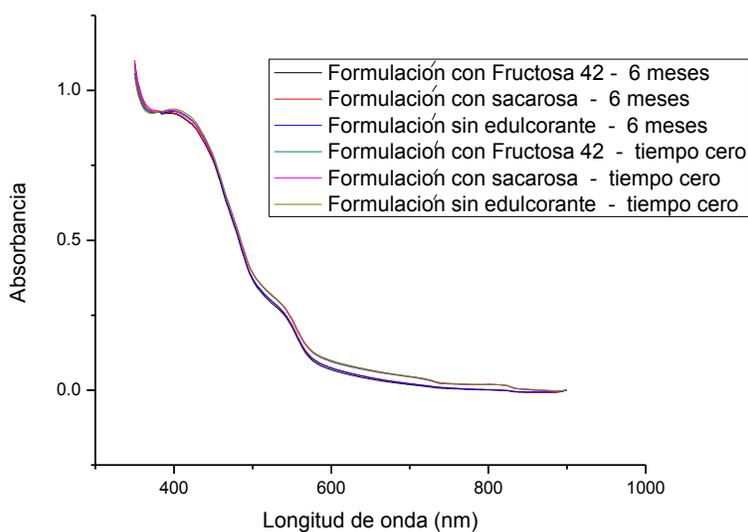


Figura 21: Evolución de los espectros de absorción de formulaciones alternativas de Amaretto en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente

Para una presentación numérica, la Tabla 5 da un listado de los valores de absorbancia a 428 nm y a 502 nm para los espectros de la Figura 21.

Tabla 5: Valores de absorbancia (a 428 nm y 502 nm) de los espectros de la Figura 21

Muestras	Tiempo		6 meses	
	Tiempo cero			
	428 nm	502 nm	428 nm	502 nm
Formulación con Fructosa 42	0.885	0.382	0.870	0.358
Formulación con sacarosa	0.882	0.382	0.873	0.364
Formulación sin edulcorante	0.893	0.382	0.883	0.362

Por otro lado, se compararon las marcas de licores A, B y C, irradiadas a 841 W/m^2 durante un período de 360 h. La Figura 22 evidencia para la marca A un notable decaimiento de color, mientras que para las marcas B y C, prácticamente no se registran cambios. Cabe notar que previamente se determinó que la marca A contiene fructosa y glucosa, mientras que la B y la C contienen sacarosa en su composición.

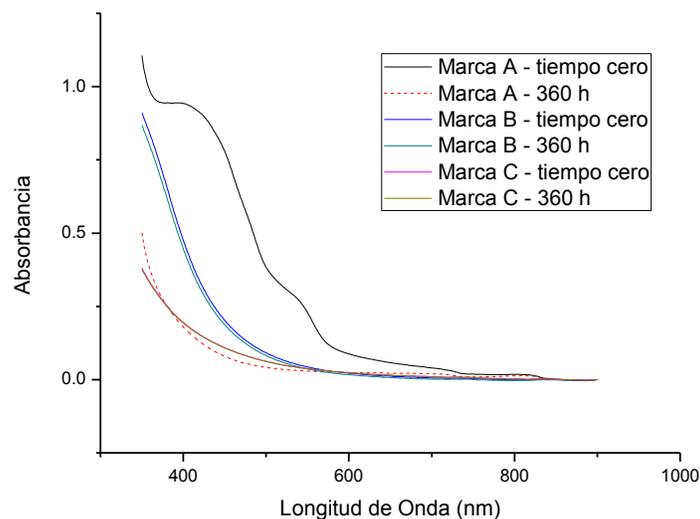


Figura 22: Evolución de los espectros de absorción de diferentes marcas de licor irradiadas a 841 W/m^2

Los experimentos de irradiación fueron llevados a cabo también con las diferentes formulaciones preparadas por la compañía proveedora del licor A, a irradiancias de 841, 652, y 290 W/m². Las Figuras 23 a 31 muestran los resultados obtenidos a las 3 irradiancias, para la formulación con Fructosa 42 al 14% (p/v) y para las formulaciones alternativas, conteniendo sacarosa al 14% (p/v) en lugar de Fructosa 42, o sin edulcorante.

Cada una de las figuras representa la evolución, en un lapso de 360 horas, de la decoloración de la formulación correspondiente, mostrando los espectros de absorción a los tiempos referidos. Las diferencias en las tasas de cambio de los espectros reflejan diferencias en la composición de los licores. Así, se puede apreciar una decoloración más rápida para la formulación preparada con Fructosa 42, en comparación con las dos formulaciones alternativas, en los tres niveles de intensidad de irradiación. Así mismo, se puede apreciar, para determinada formulación, una decoloración más rápida a mayor irradiación.

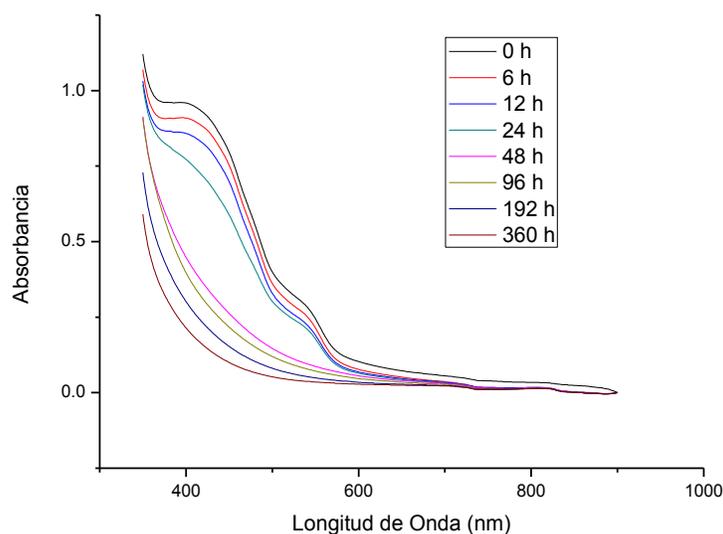


Figura 23: Evolución de los espectros de absorción de la formulación con Fructosa 42 irradiada a 841 W/m²

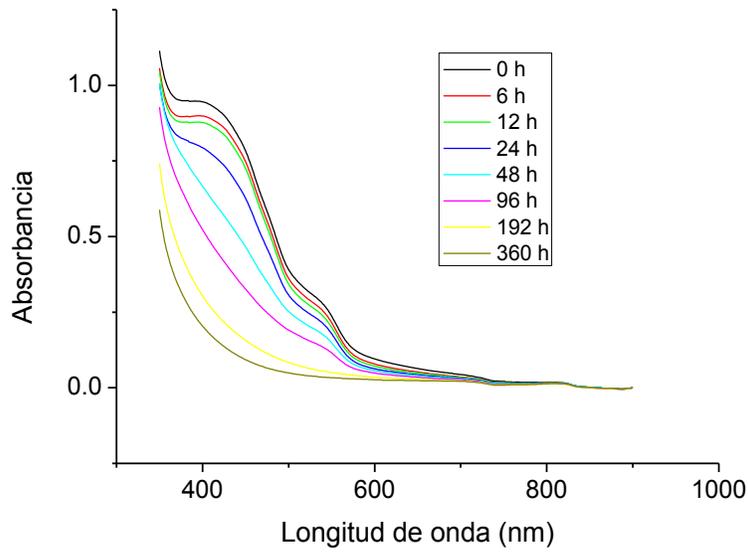


Figura 24: Evolución de espectros de absorción de la formulación preparada con sacarosa e irradiada a 841 W/m^2

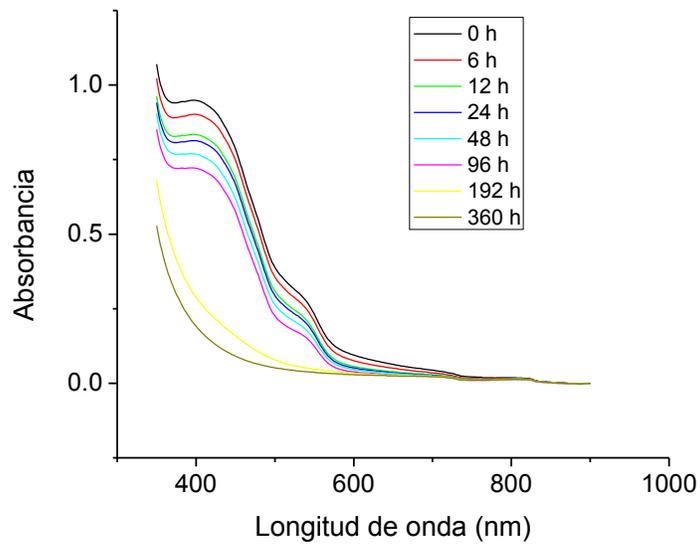


Figura 25: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada sin edulcorante e irradiada a 841 W/m^2

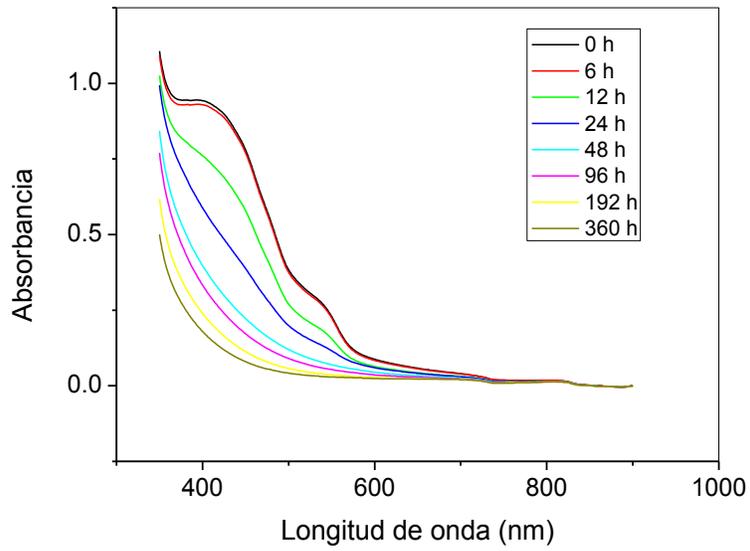


Figura 26: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con Fructosa 42 e irradiada a 652 W/m^2

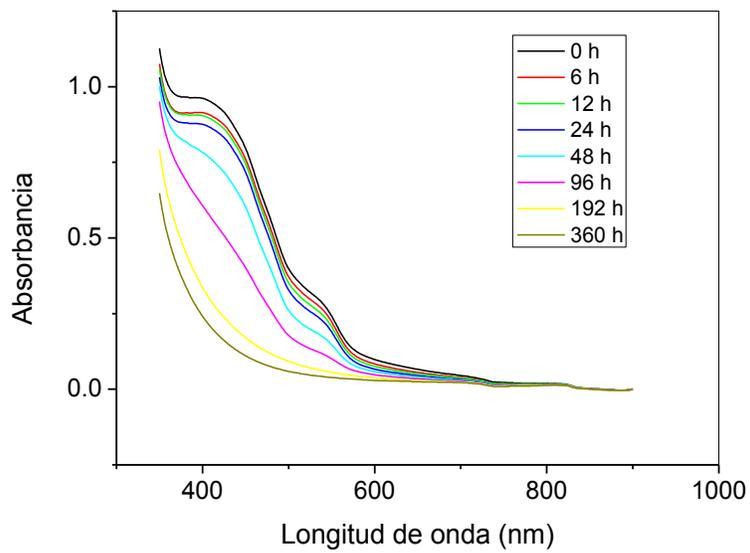


Figura 27: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con sacarosa e irradiada a 652 W/m^2

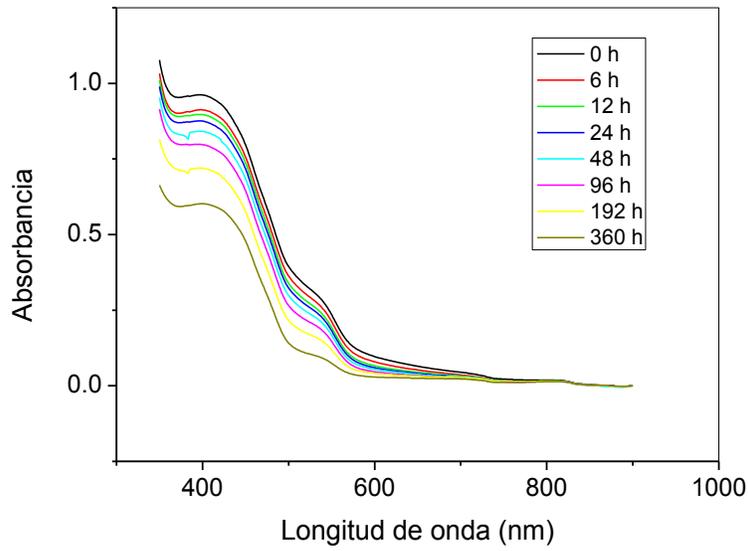


Figura 28: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada sin edulcorante e irradiada a 652 W/m^2

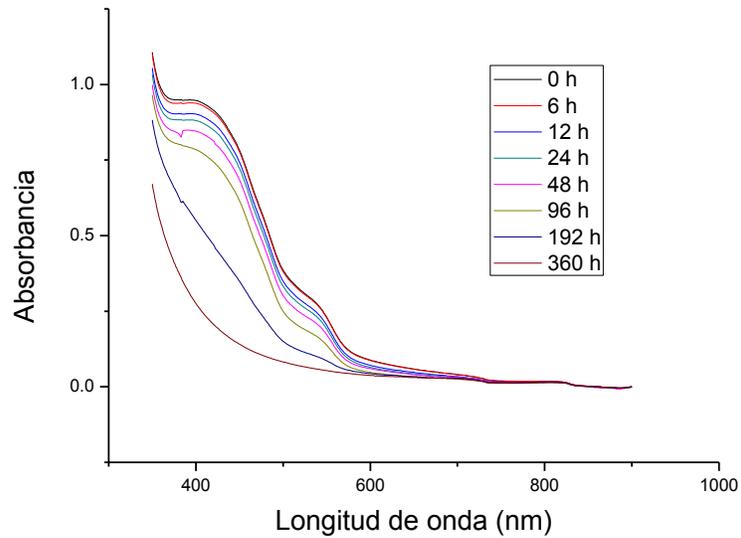


Figura 29: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con Fructosa 42 e irradiada a 290 W/m^2

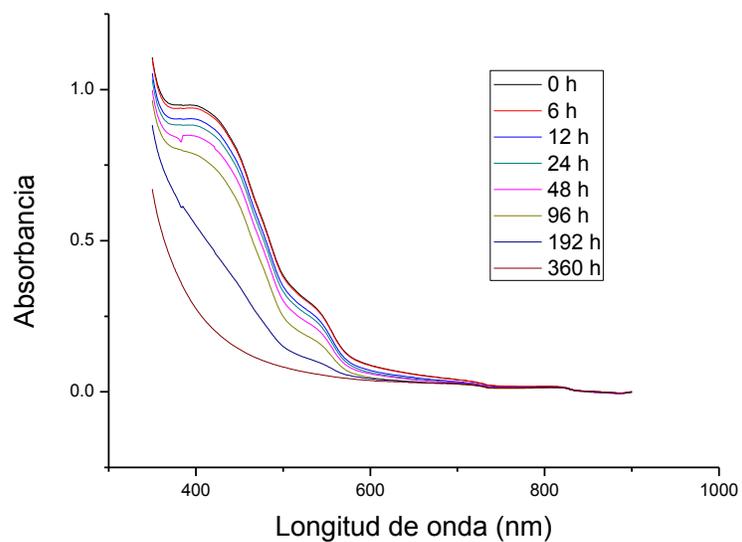


Figura 30: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada con sacarosa e irradiada a 290 W/m^2

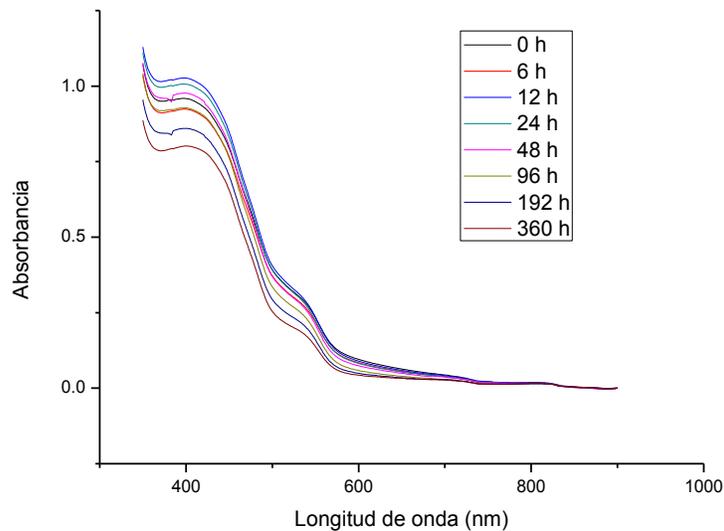


Figura 31: Evolución de los espectros de absorción de la formulación preparada sin edulcorante e irradiada a 290 W/m^2

Para un seguimiento cuantitativo de la decoloración, se graficó para cada una de las formulaciones y para cada una de las irradiancias ensayadas, el progreso en tiempo de A_{428} y A_{502} , siendo 428 nm y 502 nm las longitudes de onda de máxima absorbancia para Tartrazina y Allura Red respectivamente. En todos los casos, el seguimiento fue por un total de 360 horas. Las gráficas muestran, en cada caso, una disminución continua de la absorbancia con el tiempo. Algunas de estas gráficas se presentan en las Figuras 32 a 37 donde se incluyen las curvas del ajuste de los datos de $A = f(t)$ a la simple ecuación de decaimiento de primer orden $A = A_0 e^{-kt}$, donde A es la absorbancia (a 428 nm o 502 nm) a tiempo t , A_0 es la absorbancia a tiempo cero, y k es la constante de velocidad de primer orden para el proceso de decaimiento.

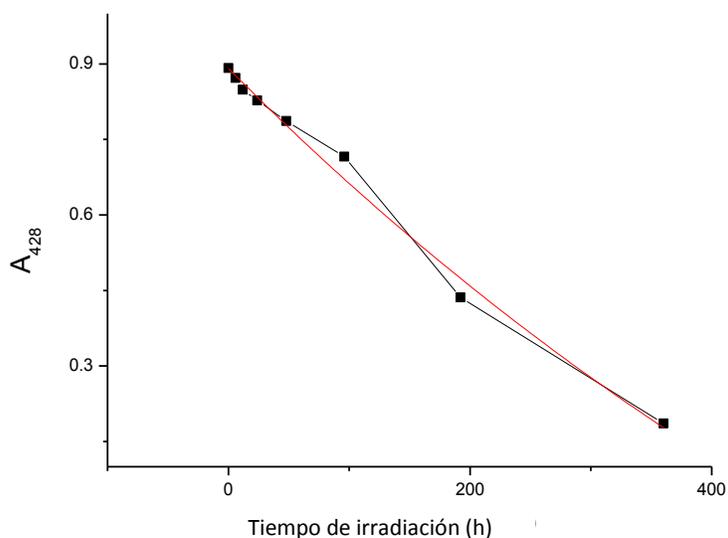


Figura 32: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 428 nm. Formulación con Fructosa 42 irradiada a 290 W/m^2

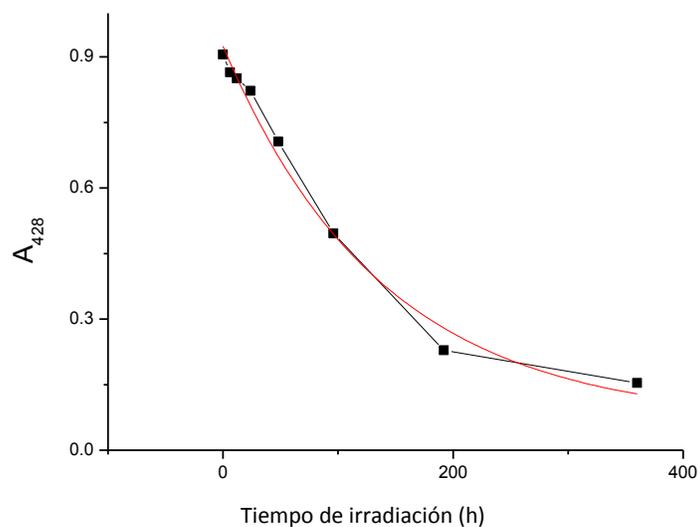


Figura 33: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 428 nm. Formulación con sacarosa irradiada a 652 W/m²

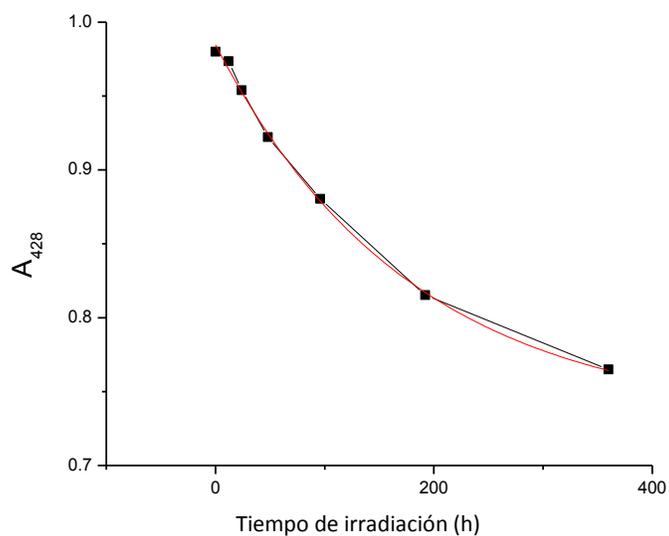


Figura 34: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 428 nm. Formulación sin edulcorante irradiada a 290 W/m²

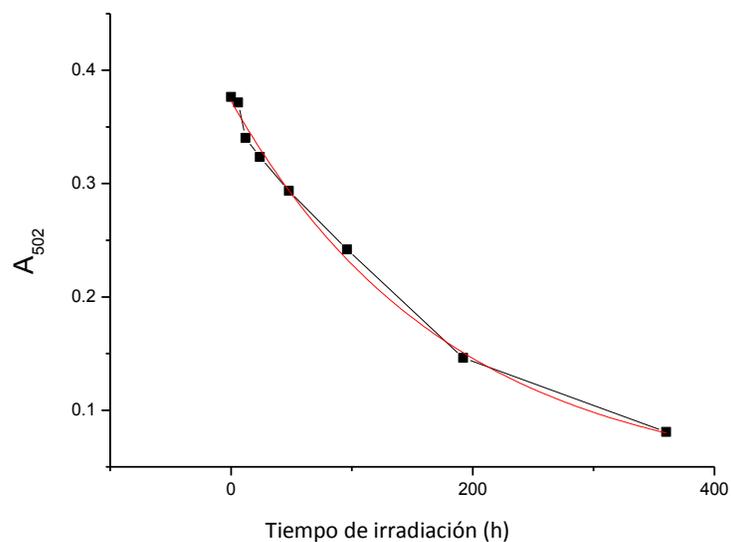


Figura 35: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 502 nm. Formulación con Fructosa 42 irradiada a 290 W/m^2

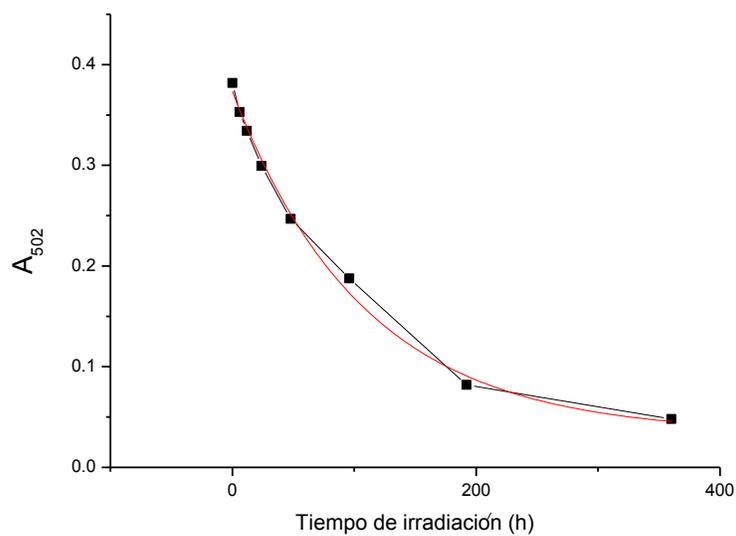


Figura 36: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 502 nm. Formulación con sacarosa irradiada a 841 W/m^2

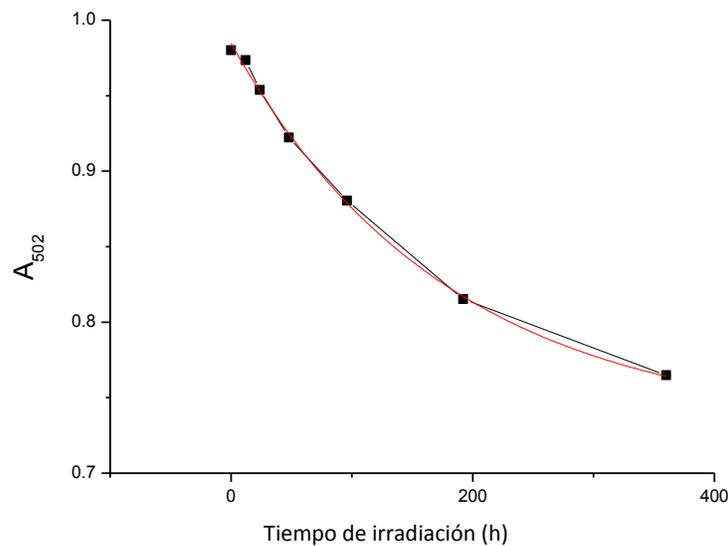


Figura 37: Ajuste de curva de cinética de decoloración a 502 nm. Formulación sin edulcorante irradiada a 290 W/m²

Los datos completos de ajustes de curvas y vida media de decaimiento de color se encuentran en las Tablas 6 y 7. Los valores listados en estas dos tablas parten de los datos experimentales de absorbancia en función del tiempo de irradiación, evaluados por algoritmos que emplean un ajuste de decaimiento de primer orden, ya sea del tipo: $A = A_0 e^{-kt}$ o del tipo $A - A_\infty = (A_0 - A_\infty) e^{-kt}$. En el primer caso, el ajuste forzosamente impone un valor de cero para A_∞ , mientras que en el segundo caso se requiere al programa definir el valor de A_∞ que diera el mejor ajuste.

Para las evaluaciones realizadas a $\lambda = 428$ nm la Tabla 6 recoge los resultados derivados de estos ajustes, en términos del coeficiente de correlación, R^2 , del tiempo medio, $t_{1/2}$, que caracteriza el decaimiento de primer orden, y de la constante de velocidad correspondiente, k . También se indica la incertidumbre porcentual que afecta cada uno de los valores de $t_{1/2}$, tal como la arrojó el programa. A su vez, la Tabla 7 resume el mismo tipo de información para las evaluaciones cinéticas realizadas a 502 nm.

En todos los casos, el valor de R^2 estuvo encima de 0.9, y en la mayoría de los casos ampliamente excedía este valor. Se observa que, por lo general, la calidad del ajuste fue

superior cuando el programa utilizó un valor optimizado de A_{∞} . Sin embargo, en algunos casos el ajuste del segundo tipo arrojó valores negativos para A_{∞} , y en estos casos los valores del error porcentual en el tiempo medio calculado por el algoritmo fueron elevados, lo que significa errores altos en los valores correspondientes calculados para k .

Es por esta razón que se utilizaron en esta tesis los valores cinéticos calculados con el primer tipo de ajuste, es decir $A = A_0 e^{-kt}$, como también se hizo en el artículo publicado (Castañeda-Olivares y col., 2010). De todas maneras, ambos tipos de ajuste producen valores que muestran las mismas tendencias, de manera que la selección del tipo de ajuste no afecta en medida significativa la interpretación de los efectos de los diferentes parámetros sobre el fenómeno de la decoloración del licor tipo Amaretto.

Comparando las constantes k de primer orden, podemos observar las siguientes tendencias:

- a) Comparando el mismo tipo de reacción, los valores de k crecen cuando se incrementa la irradiancia, como se podría esperar para una fotorreacción.
- b) En experimentos comparables, la constante de velocidad de decaimiento para A_{428} y para A_{502} son similares, aunque por lo general los valores de k son algo más elevados para este último caso, indicando que en todas estas condiciones Allura Red es más sensible que la Tartrazina.
- c) Bajo condiciones comparables, la constante de velocidad de decaimiento decrece en la siguiente secuencia: formulación con Fructosa 42 – formulación con sacarosa – formulación sin edulcorante añadido.

Tabla 6: Resumen de parámetros cinéticos para A₄₂₈

Para A_∞ = 0:				
Formulación:	Irradiancia:	841 W/m²	652 W/m²	290 W/m²
Parámetros:				
Con Fructosa 42	A₀	0.891	0.903	0.909
	R²	0.902	0.901	0.972
	t_{1/2} [h]	35.0 (±23%)	53.6 (±23%)	186.7 (±9%)
	k [h⁻¹]	0.0198	0.0129	0.0037
Con sacarosa	A₀	0.882	0.917	0.910
	R²	0.982	0.985	0.995
	t_{1/2} [h]	89.5 (±11%)	112.1 (±8%)	296.31 (±3%)
	k [h⁻¹]	0.0077	0.0062	0.0023
Sin edulcorante	A₀	0.894	0.867	0.966
	R²	0.931	0.955	0.939
	t_{1/2} [h]	129.8 (±101%)	554.5 (±9%)	948.6 (±11%)
	k [h⁻¹]	0.0054	0.0013	0.0007
Para A_∞ autoajustado:				
Formulación:	Irradiancia:	841 W/m²	652 W/m²	290 W/m²
Parámetros:				
Con Fructosa 42	A₀	0.936	0.947	0.891
	R²	0.972	0.960	0.998
	t_{1/2} [h]	21.2 (±18%)	31.3 (±22%)	604.9 (±76%)
	k [h⁻¹]	0.0327	0.0221	0.0012
Con sacarosa	A₀	0.902	0.925	0.912
	R²	0.989	0.986	0.995
	t_{1/2} [h]	63.8 (±13%)	95.9 (±18%)	256.6 (±22%)
	k [h⁻¹]	0.0108	0.0072	0.0027
Sin edulcorante	A₀	0.884	0.879	0.985
	R²	0.924	0.971	0.998
	t_{1/2} [h]	173.9 (±62%)	155.3 (±34%)	123.8 (±9%)
	k [h⁻¹]	0.0040	0.0045	0.0056

Tabla 7: Resumen de parámetros cinéticos para A₅₀₂

Para A_∞ = 0:				
Formulación:	Irradiancia	841 W/m²	652 W/m²	290 W/m²
Parámetros:				
Con Fructosa 42	A₀	0.374	0.379	0.370
	R²	0.917	0.920	0.993
	t_{1/2} [h]	31.8 (±22%)	52.5 (±21%)	151(±5%)
	k [h⁻¹]	0.0218	0.0132	0.0046
Con sacarosa	A₀	0.368	0.379	0.382
	R²	0.989	0.986	0.993
	t_{1/2} [h]	93.5 (±7%)	91.8 (±8%)	177.8 (±5%)
	k [h⁻¹]	0.0074	0.0076	0.0039
Sin edulcorante	A₀	0.355	0.353	0.383
	R²	0.960	0.951	0.912
	t_{1/2} [h]	106.1 (±13%)	242.4 (±11%)	558.1 (±13%)
	k [h⁻¹]	0.0065	0.0029	0.0012
Para A_∞ autoajustado:				
Formulación:	Irradiancia:	841 W/m²	652 W/m²	290 W/m²
Parámetros:				
Con Fructosa 42	A₀	0.390	0.396	0.373
	R²	0.971	0.966	0.994
	t_{1/2} [h]	20.5 (±17%)	32.4 (±20%)	125.3 (±14%)
	k [h⁻¹]	0.0339	0.0214	0.0055
Con sacarosa	A₀	0.373	0.387	0.386
	R²	0.994	0.999	0.995
	t_{1/2} [h]	74.9 (±10%)	66.5 (±4%)	138.4 (±13%)
	k [h⁻¹]	0.0093	0.0104	0.0050
Sin edulcorante	A₀	0.357	0.361	0.389
	R²	0.954	0.958	0.927
	t_{1/2} [h]	93.5 (±31%)	121.8 (±35%)	154 (±55%)
	k [h⁻¹]	0.0074	0.0057	0.0045

El hecho de que, tanto para la Tartrazina como para Allura Red, la reacción de decoloración es favorecida por fructosa o glucosa, en preferencia sobre la sacarosa, sugiere que los grupos reductores de estos monosacáridos están involucrados en la reacción. La degradación de compuestos azoicos a través de la reducción por microorganismos o por azorreductasas derivadas de ellos, es bien conocida (Chung y col., 1978; Rafii y Cerniglia 1995; Hu 2001; Delée y col., 1998; Mezőhegyi y col., 2007; Li y Guthrie, 2010; Macwana y col., 2010), pero también hay reportes de reducción catódica de estos compuestos en celdas electrolíticas (Bechthold y col., 2001; Sakalis y col., 2005; Fernández Sanchis, 2006), así como la reducción química por reactivos tales como el polvo de zinc (Gowda y col., 2002; Sridhara y col., 2004) o hidracina (Ross y Warwick, 1955; Zhang y Wang, 2003; Pasha y Nanjundaswami, 2005; Koppes y col., 2008; Rollas, 2010).

La diferencia de reactividad entre monosacáridos reductores y sacarosa no reductora en esta decoloración de colorantes azoicos puede ser mayor a la observada en estas comparaciones entre diferentes formulaciones, ya que todas las muestras proporcionadas por el productor de Amaretto, contenían una cantidad significativa de maltodextrina, la cual debiera de ser activa en la reacción a través de su terminal reductora. También es posible que otros componentes de la formulación, en particular las esencias y saborizantes añadidos puedan contener compuestos que pudieran participar en la reacción. Por esta razón, se consideró de interés examinar, bajo irradiación, la interacción de varios edulcorantes con los colorantes azoicos en mezclas químicamente bien definidas, pero en los demás aspectos bajo condiciones similares a las que imperaban en el caso de las formulaciones de Amaretto. Para esto, el solvente utilizado fue etanol-agua (28:72, v/v), y los azúcares, los cuales fueron de grado reactivo, se emplearon en concentraciones similares a los que se usaron en las formulaciones alternativas de Amaretto (14% D-Fructosa, 14% D-glucosa, 14% sacarosa). Además, los reactivos Tartrazina y Allura Red fueron usados en concentraciones similares a las presentes en las formulaciones de Amaretto.

La Figura 38 muestra, tras diferentes tiempos de irradiación, el espectro de absorción de la mezcla que contiene Allura Red y D-fructosa, irradiada a temperatura ambiente a 652 W/m². Se observa un decremento continuo de la A₅₀₂ durante la reacción, y la banda prácticamente desapareció después de 192 horas. Un efecto similar fue observado en la

reacción que contenía Tartrazina y D-fructosa (Figura 42), pero con una cinética más lenta, ya que una considerable absorbancia a 428 nm seguía siendo evidente después de 360 horas de irradiación a 652 W/m^2 . Una decoloración más lenta, pero aún significativa, se observó para la mezcla que contiene Allura Red y D-glucosa (Figura 39). En las otras pruebas de irradiación examinadas (Tartrazina y glucosa (Figura 43); Allura Red y sacarosa (Figura 40); Tartrazina y sacarosa (Figura 44); Allura Red o Tartrazina sin ningún azúcar añadido (Figuras 41 y 45)), la decoloración fue mínima o indetectable: en todos estos casos, un decrecimiento de menos del 4% fue observado a 502 nm y 428 nm, tras un tiempo de 360 h irradiación a 652 W/m^2 .

Las Figuras 46 y 47 muestran el desarrollo en el tiempo, de las A_{502} y A_{428} , de estos experimentos. Es evidente una mayor actividad de fotodegradación con la fructosa, comparada con las otras condiciones. El otro aspecto que destaca es el hecho de que la degradación de los colorantes azoicos, en presencia de D-fructosa, no sigue una cinética simple de decaimiento de primer orden, un hecho que ya se deducía de la simple inspección de los espectros de muestra en las Figuras 38 y 42. Se observa que un periodo lento de decaimiento en la máxima absorbancia es seguido por una fase de decoloración mucho más rápida.

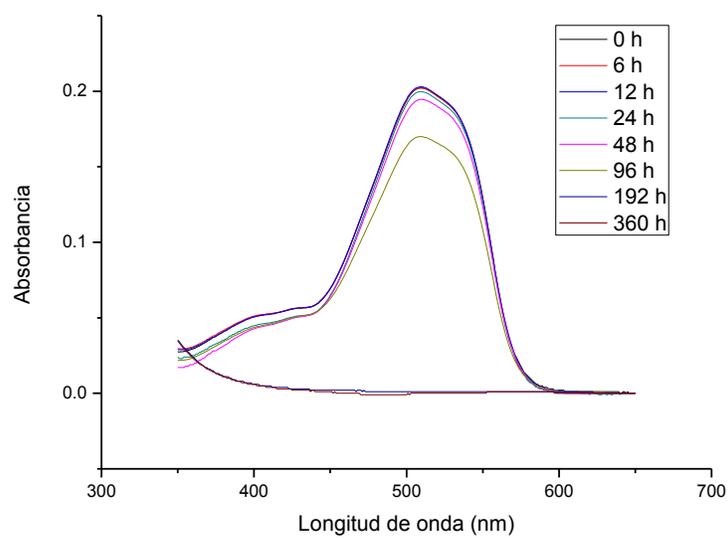


Figura 38: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/fructosa irradiada a 652 W/m^2

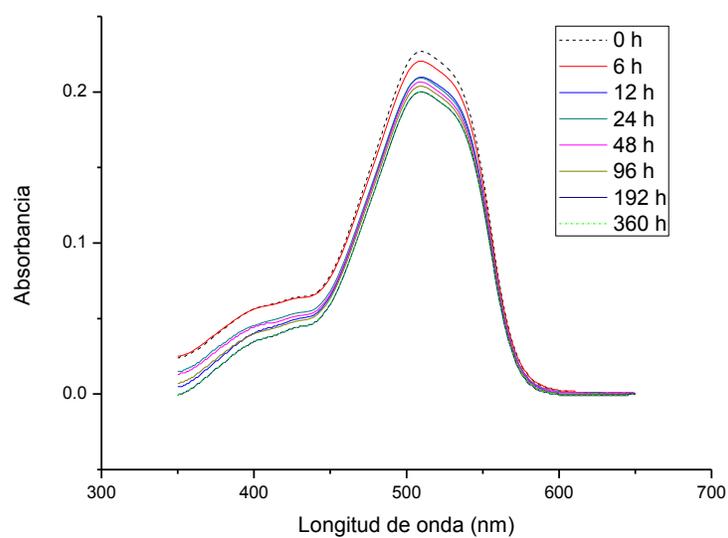


Figura 39: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/glucosa irradiada a 652 W/m^2

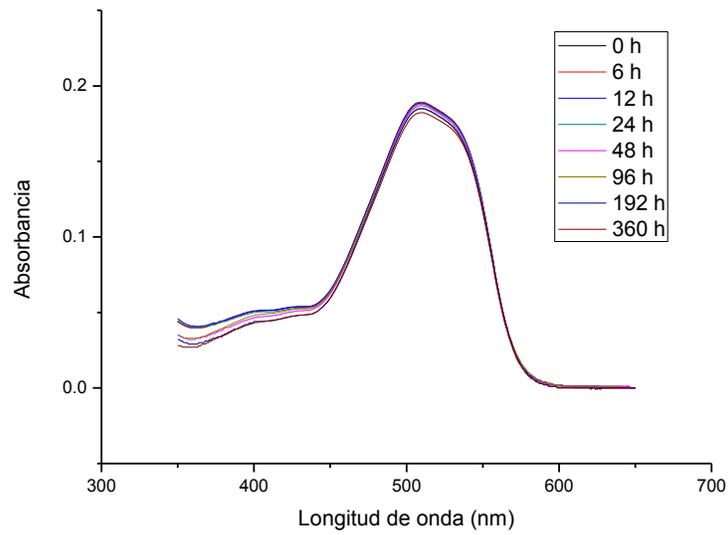


Figura 40: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/sacarosa irradiada a 652 W/m^2

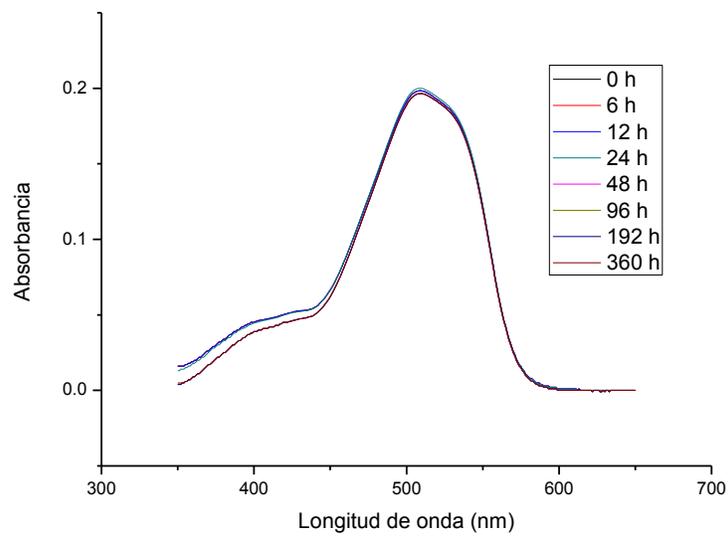


Figura 41: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Allura Red/sin edulcorante irradiada a 652 W/m^2

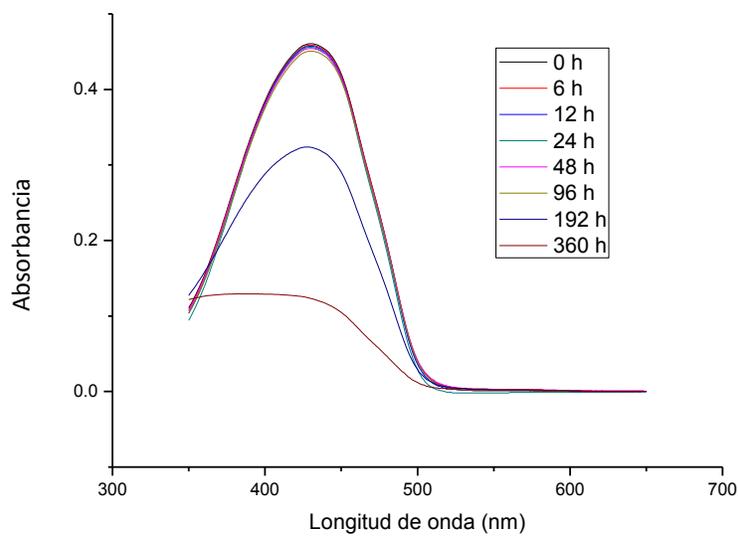


Figura 42: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/fructosa irradiada a 652 W/m^2

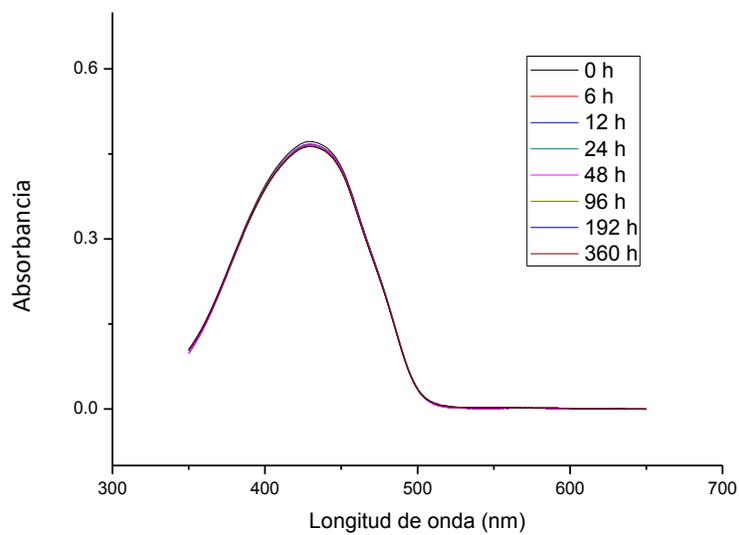


Figura 43: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/glucosa irradiada a 652 W/m^2

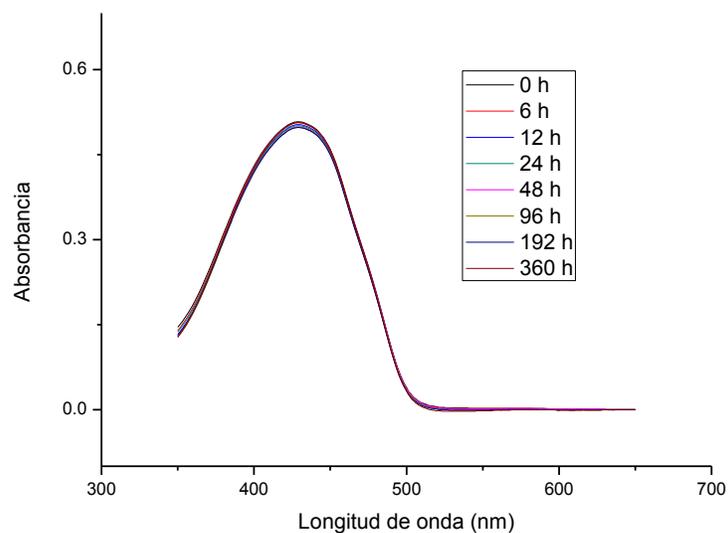


Figura 44: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/sacarosa irradiada a 652 W/m^2

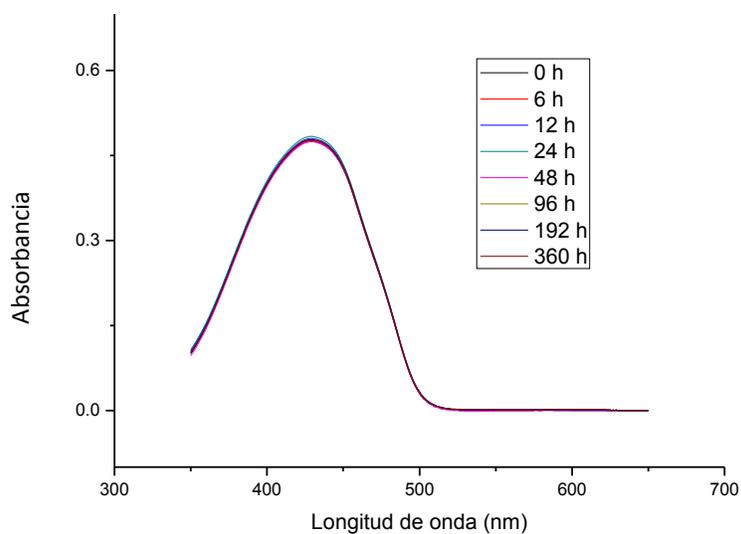


Figura 45: Evolución del espectro de absorción de la mezcla Tartrazina/sin edulcorante irradiada a 652 W/m^2

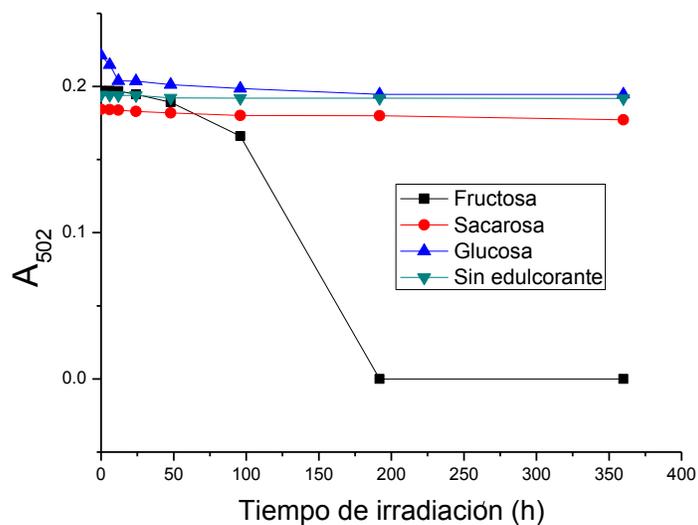


Figura 46: Cinética de decoloración de Allura Red en presencia de edulcorantes

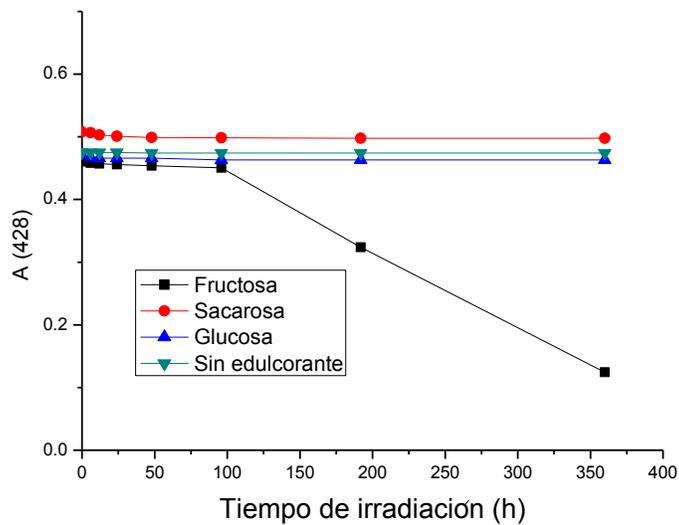


Figura 47: Cinética de decoloración de Tartrazina en presencia de edulcorantes

En el supuesto de que este efecto podría ser causado por el sombreado interno de la muestra, los experimentos que involucraron las combinaciones (Allura Red/D-fructosa) y

(Tartrazina /D-fructosa) fueron repetidas bajo condiciones idénticas, con la diferencia de que fueron llevadas a cabo en celdas delgadas de cuarzo, con un paso de 0.1 cm, mientras que todos los otros experimentos en este estudio usaron celdas de 1 cm de paso. Los resultados, presentados en la Figura 48, muestran que bajo estas condiciones las reacciones siguen una cinética de decaimiento más normal, con un razonable ajuste a un decaimiento exponencial de primer orden, aunque la calidad de los datos es pobre, debido a la baja respuesta en la señal de absorbancia bajo estas condiciones.

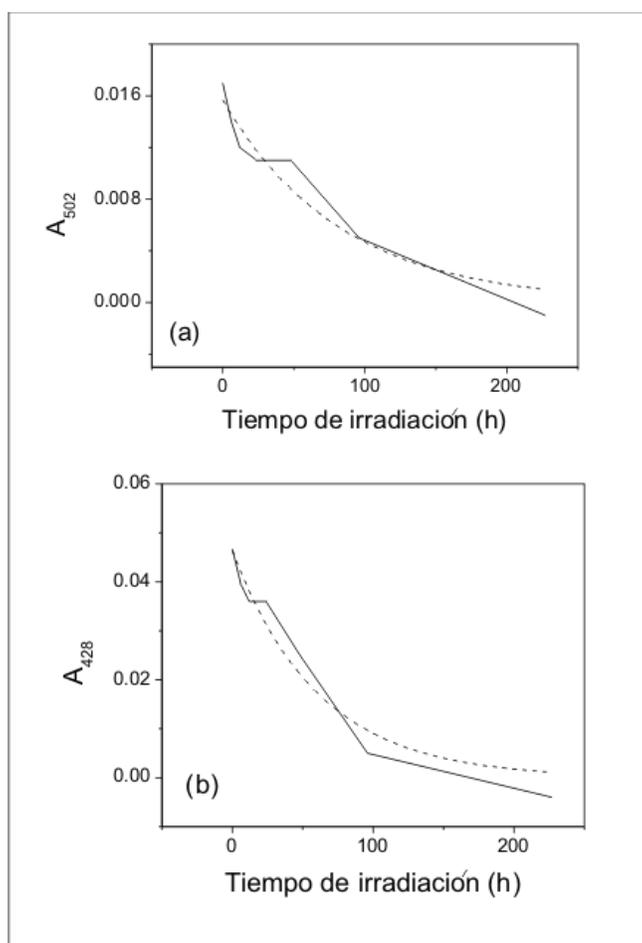


Figura 48: Ajustes de las curvas de cinética de decoloración (a) a 502 nm (Allura Red/fructosa) y (b) a 428 nm, para fotorreacciones realizadas en cubetas de 1 mm de paso.

Por lo tanto, la suposición de que el sombreado interno afectó significativamente los experimentos realizados en las celdas de 1 cm se ve confirmada.

Los análisis de los azúcares en la formulación con Fructosa 42 fueron realizados en HPLC usando la columna Aminex HPX-87P, mostrando tres bandas principales en el perfil cromatográfico del índice de refracción, centradas a 12.5 min, 16.7 min, and 19.0 min de tiempo de retención (Figura 49). La primera y tercera de estas bandas fueron interpretadas como glucosa y fructosa, respectivamente, sobre la base de estos tiempos de retención, un resultado lógico ya que la Fructosa 42 es una mezcla equimolar de estos dos monosacáridos. La banda de elución a 16.7 minutos puede estar relacionada con la maltodextrina añadida en la fabricación del licor, para darle cuerpo al producto final. Las Figuras 49a y 49b muestran el cromatograma a tiempo cero y después de 360 horas de irradiación en una celda de 1 cm de paso a 841 W/m^2 , indicando que esencialmente no hay cambios en la composición de azúcares durante esta irradiación. Similarmente, el resultado de la irradiación a 841 W/m^2 durante 360 horas de la formulación con sacarosa muestra la banda cromatográfica principal a 10.2 min, identificada como sacarosa por su tiempo de retención, y una segunda banda a 16.7 min (Figura 50 (a)), sin cambios a partir de la obtenida a tiempo cero (Figura 50 (b)).

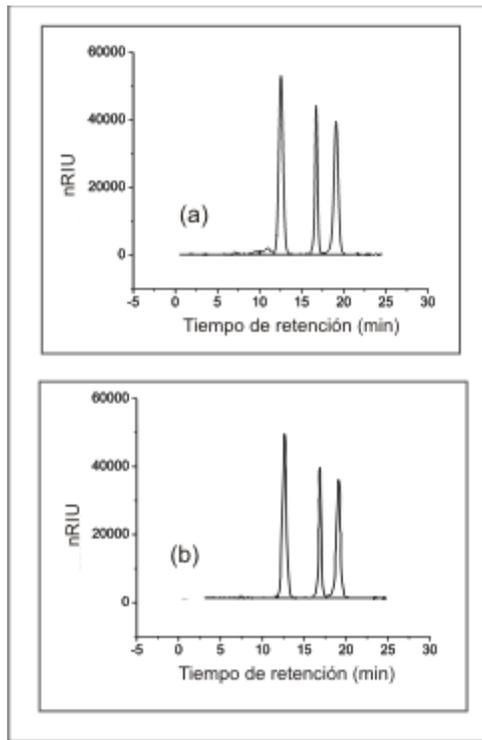


Figura 49: Análisis en HPLC de edulcorantes en la formulación con Fructosa 42 irradiadas a 841 W/m^2 a tiempos de irradiación: (a) 0 h; (b) 360 h

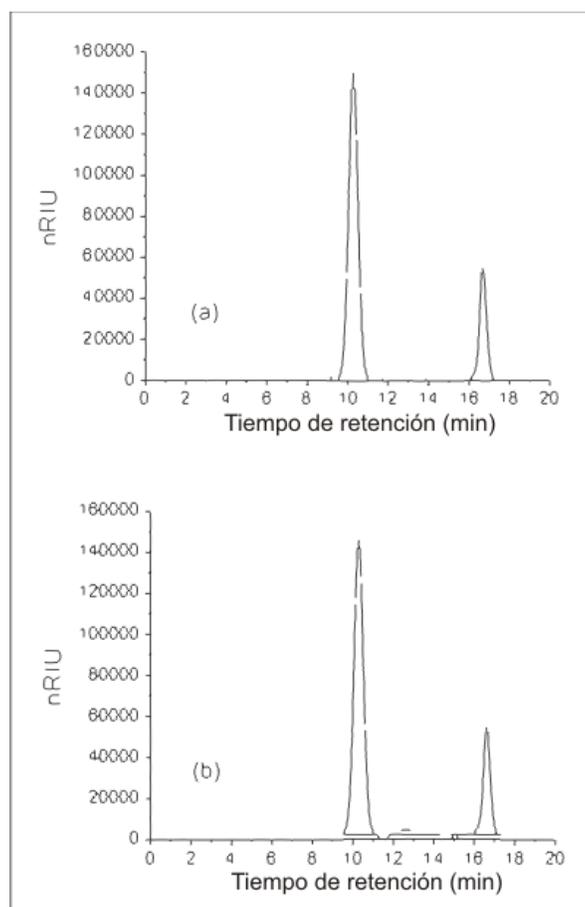


Figura 50: Análisis en HPLC de edulcorantes en la formulación con sacarosa irradiadas a 841 W/m^2 , a tiempos de irradiación: (a) 0 h; (b) 360 h

El análisis de colorantes de la formulación con Fructosa 42 se realizó con la columna XDB-C18 y con un gradiente lineal de agua-metanol, con el monitoreo de la absorbancia a 428 nm y 502 nm, mostrando las principales bandas (Figuras 51 y 52, respectivamente) eluídas a 4.1 min (registro principal a 428 nm y menormente a 502 nm) y a 7.0 min (registro principal a 502 nm y menormente a 428 nm), interpretadas como Tartrazina y Allura Red, respectivamente, sobre la base de los tiempos de elución y su espectro de absorción. Las bandas cromatográficas de la Tartrazina, resultantes de las formulaciones con Fructosa 42, sacarosa y sin edulcorante, se muestran en las Figuras 51, 52 y 53, respectivamente donde se observa similitud al estándar de Tartrazina (Figura 19) en sus tiempos de retención. Se nota que la alta irradiancia empleada (841 W/m^2) en todas las muestras, provoca una

pérdida total del colorante a 360 h (Figuras 51, 52 y 53), pero se vuelve más evidente al analizarla con HPLC en tiempos intermedios, donde se observa la diferencia de velocidades. Durante la irradiación de la formulación preparada con Fructosa 42 a 841 W/m^2 en las cubetas de 1-cm, el contenido de Tartrazina y de Allura Red se ve reducido después de 48 horas, y prácticamente eliminado después de 96 horas (Figuras 54 y 55), indicando que la reducción general de color a 428 nm y 502 nm observada en el espectro de absorción de las formulaciones irradiadas (Figuras 23 a 31) en efecto reflejan el consumo de Tartrazina y Allura Red.

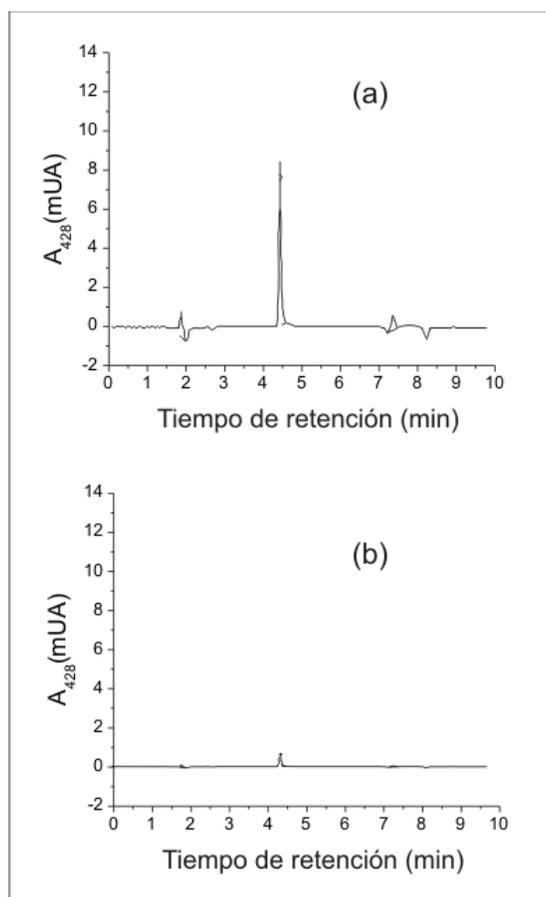


Figura 51: Análisis en HPLC de Tartrazina en la formulación con Fructosa 42, irradiada a 841 W/m^2 durante: (a) 0 h y (b) 360 h

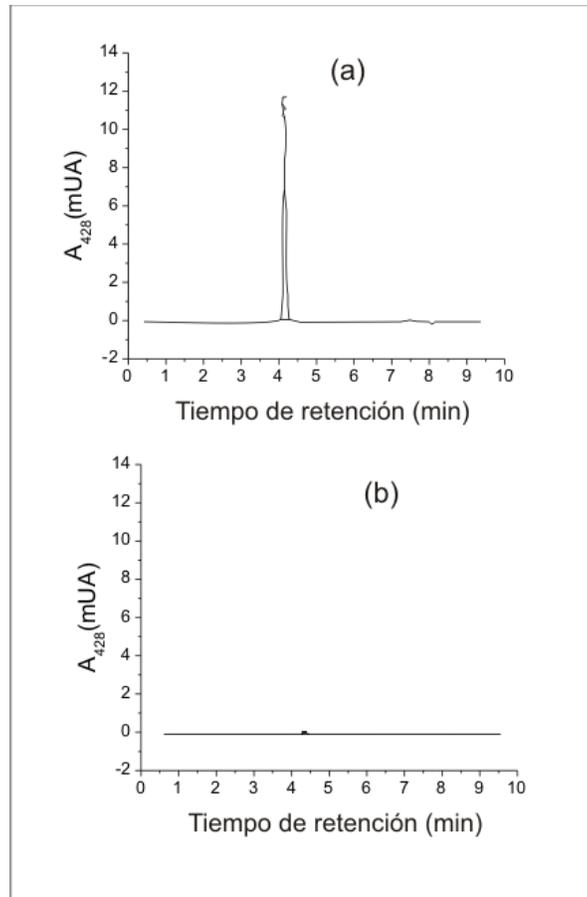


Figura 52: Análisis en HPLC de Tartrazina en la formulación con sacarosa, irradiada a 841 W/m^2 durante: (a) 0 h y (b) 360 h

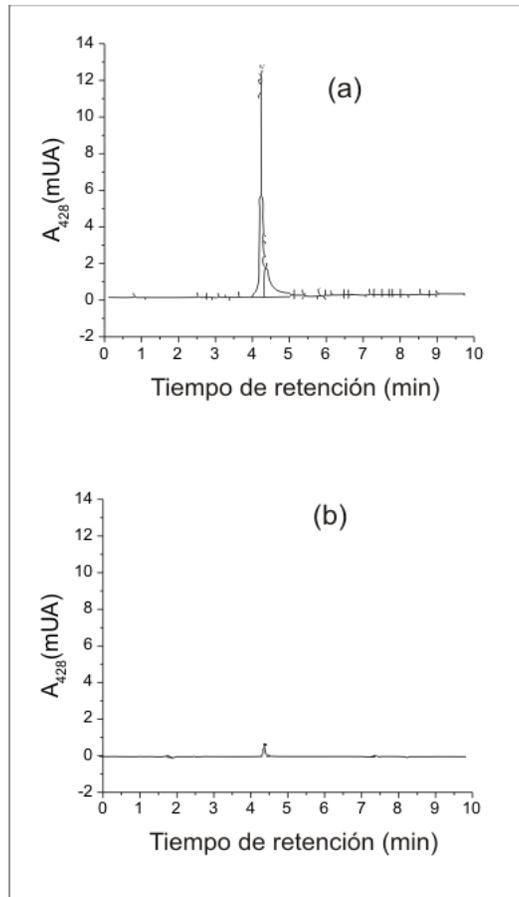


Figura 53: Análisis en HPLC de Tartrazina en la formulación sin edulcorante, irradiada a 841 W/m^2 durante: (a) 0 h y (b) 360 h

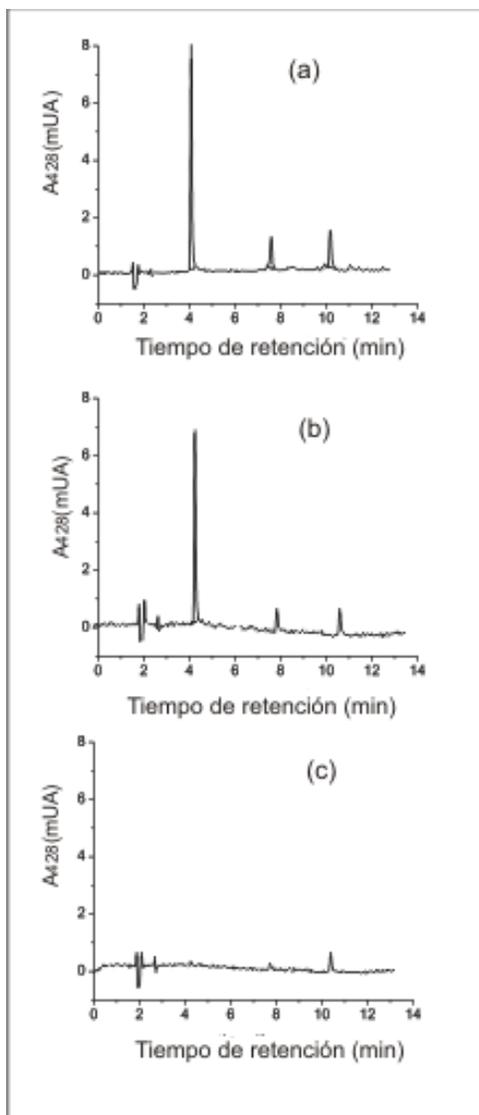


Figura 54: Cinética de decoloración de Tartrazina en la formulación con Fructosa 42, irradiada a 841 W/m^2 durante: (a) 0 h; (b) 48 h; (c) 96 h

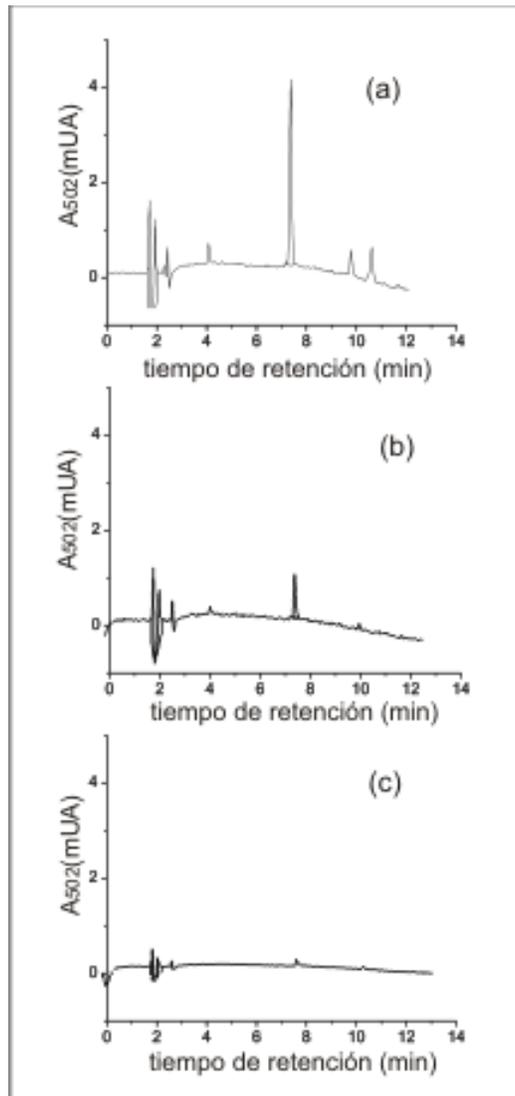


Figura 55: Cinética de decoloración de Allura Red en la formulación con Fructosa 42, irradiada a 841 W/m^2 durante: (a) 0 h; (b) 48 h; (c) 96 h

De especial interés en los resultados reportados aquí es la exigencia de la presencia de luz para la degradación de los compuestos azoicos por los monosacáridos que se ha demostrado. Esto podría indicar que las moléculas de colorante participan en la reacción de decoloración solamente en su estado excitado. Otra explicación se basaría en la consideración de las formas *cis* y *trans* de los componentes azoicos. Generalmente, los compuestos arilazoicos tienen preponderantemente la configuración *trans*, pero existe una interconversión fotoactivada entre los dos isómeros (Brode y col., 1952; Gabor y Bar-Eli, 1968; Simonov y Lavrichev, 1999), la cual podría ayudar a obtener la configuración menos estable *cis*, y es esta última configuración la que se presta a la formación de la geometría cíclica necesaria para la reacción concertada entre compuestos azoicos y monosacáridos; en esta interpretación, la contribución de la luz sería la conversión de la configuración preferencial *trans* del compuesto azoico, a la configuración *cis*.

Capítulo 8. DISCUSIÓN

El resultado central del presente trabajo es la descripción de una fotorreacción de la Tartrazina o de Allura Red con los azúcares D-fructosa o D-glucosa, a temperatura ambiente y en medio etanólico-acuoso; en estas condiciones no se dieron ni la correspondiente reacción en oscuro ni la fotorreacción con sacarosa reemplazando a la fructosa o la glucosa. Generalizando, se trata de una fotorreacción de azoarenos con azúcares reductores.

Tal reacción no se ha descrito anteriormente en la literatura. Los antecedentes más cercanos, que son los trabajos publicados por Kunitou y col. (2002) y por Ross (1975), difieren en aspectos fundamentales de la reacción aquí descubierta. En el primero de los trabajos citados, la fuente de luz fue una lámpara de mercurio de alta presión, por lo que la radiación emitida fue preponderantemente luz ultravioleta, a diferencia del trabajo actual, realizado con una lámpara de luz visible. Además, los experimentos que Kunitou y col. (2002) realizaron con una variedad de colorantes azoicos generalmente se llevaron a cabo en presencia de TiO_2 y esto fue un requerimiento para la reactividad, puesto que reacciones en ausencia de TiO_2 , sea en presencia de glucosa o en su ausencia, reducían la reacción del colorante azoico ensayado a prácticamente cero. En contraste, en el presente trabajo no se utilizó TiO_2 . Otro punto importante del trabajo de Kunitou y col. (2002) es que la medida en que azúcares reductores (glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, lactosa) propician la fotorreacción del compuesto azoico en presencia de TiO_2 , sólo difiere por un factor de 2 del efecto que se observa con disacáridos no reductores (sacarosa, trehalosa), a diferencia del presente trabajo, que demostró una diferencia dramática entre sacáridos reductores y no reductores en su capacidad de acelerar la fotodecoloración de los colorantes azoicos, tal como se observa en la Figura 22 al comparar tres marcas de licores con diferente composición de edulcorantes. Kunitou y col. (2002) interpretan la reacción que observaron, en términos de una fotoactivación del semiconductor, con la consabida formación de electrones de conducción y de huecos, creando especies reactivas que degradan los compuestos azoicos, y consideran que el efecto acelerador de los sacáridos reductores o no reductores añadidos en los diversos experimentos se debe a que causan una reducción de la constante dieléctrica de la suspensión de TiO_2 , lo que permite que la

reacción con los colorantes compita más eficientemente con la recombinación de huecos y electrones en el semiconductor. En esta interpretación, los sacáridos no están químicamente involucrados en la reacción de descomposición del colorante azoico.

El trabajo de Ross (1975) sobre la degradación de Amaranto y de Allura Red en presencia de fructosa o glucosa se llevó a cabo sin adición de TiO_2 . El artículo no menciona una irradiación de la reacción, por lo que se interpreta como reacción oscura, aunque tampoco se declara que la luz ambiental fuera expresamente excluida. Esto está en contraste con el presente trabajo, donde el requerimiento de luz quedó claramente documentado. En el trabajo de Ross (1975), las reacciones en presencia de fructosa o glucosa sólo procedieron a temperaturas elevadas; a 22°C , no se detectó reacción de fructosa (1 M) ni con Amaranto ni con Allura Red. El autor interpreta la degradación de los colorantes azoicos como una reducción al estado de las $\text{N,N}'$ -diarilhidracinas o las anilinas, postulando como los agentes activos en esta reacción a productos fuertemente reductores (glicolaldehído, gliceraldehído, dihidroxiacetona, otros) de la descomposición térmica de la fructosa o glucosa. Estos α -hidroxialdehídos o α -hidroxicetonas se conocen como “reductones” y se caracterizan por ser fuertemente reductores en ambiente básico, lo que estaría alineado con la observación de Ross (1975) que la degradación de los colorantes se veía acelerada a pH elevado. En las condiciones del presente estudio no se detectó la formación de estos tipos de compuestos; los experimentos de control no indicaron ningún cambio en la composición de los sacáridos en la solución, incluso tras largos tiempos de irradiación. Las reacciones reportadas por Ross (1975) también difieren claramente de los descritos en el presente trabajo en el aspecto de temperatura de reacción, ya que en este estudio la degradación de los colorantes se dió con tasa significativa a temperatura de 25°C .

El mecanismo de las fotorreacciones a baja temperatura aquí documentadas queda por determinar, pero se puede postular la posibilidad de un proceso concertado entre azoareno, luz y azúcar reductor. Una de las posibilidades sería un proceso cíclico como el que se presenta en la Figura 56, donde se muestra el ejemplo de la fructosa, en su forma tautomérica de enodiol, entregando un hidrógeno como hidruro al grupo azo en su configuración *cis*, obteniéndose como resultado final la reducción del compuesto azoico a la $\text{N,N}'$ -diarilhidracina correspondiente y la oxidación del sacárido a la α -dicetona. El

isómero *cis* del compuesto azoico, que se muestra en la Figura 56, se presta mejor al estado de transición cíclica y concertada que se propone, comparado con el isómero *trans*, el cual incurriría choques estéricos en la estructura de transición. Esto provee una explicación para el requerimiento de irradiación que tiene esta reacción: el efecto central de la luz incidente sería la conversión fotoquímica del compuesto azoico de su forma preponderante *trans* a la forma *cis*, que es la que puede participar en el mecanismo cíclico con el azúcar reductor que lleva a los productos.

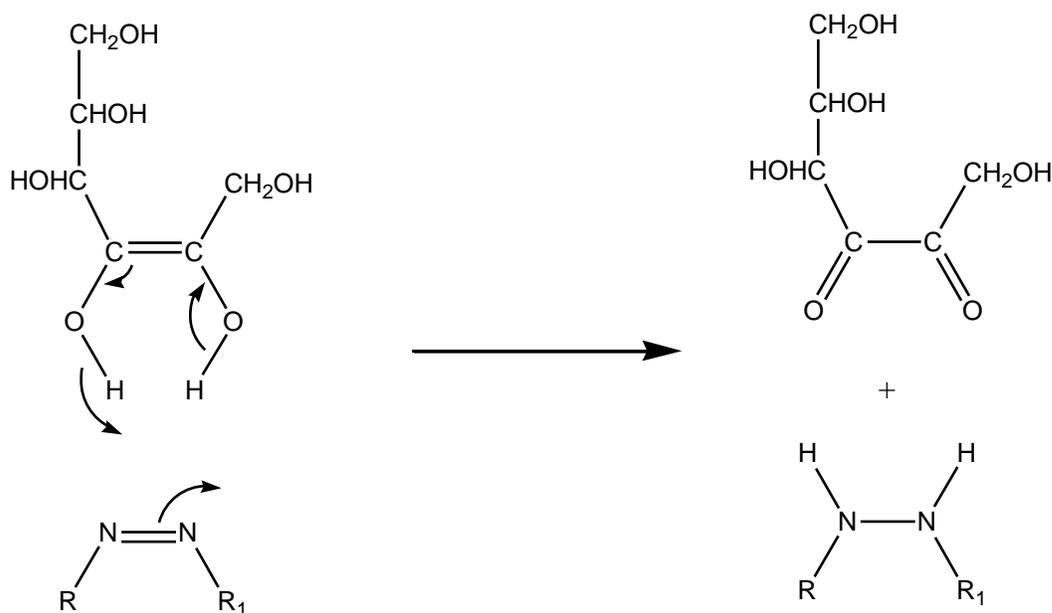


Figura 56: Esquema propuesto para la reacción de fructosa con un compuesto arilazoico en configuración *cis*

Para evaluar la factibilidad de estas reacciones desde el punto de vista termodinámico, se utilizó la química computacional conforme al procedimiento descrito. A continuación se presentan las estructuras generadas con su geometría para los diferentes compuestos considerados.

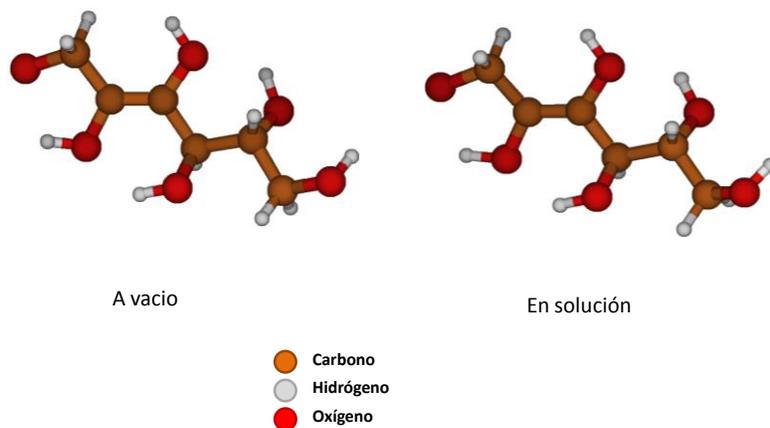


Figura 57 Comparación de geometría de la *trans*-fructosa (forma enediol) calculada en PM6 (semiempírico) a vacío y en solución (agua como disolvente)

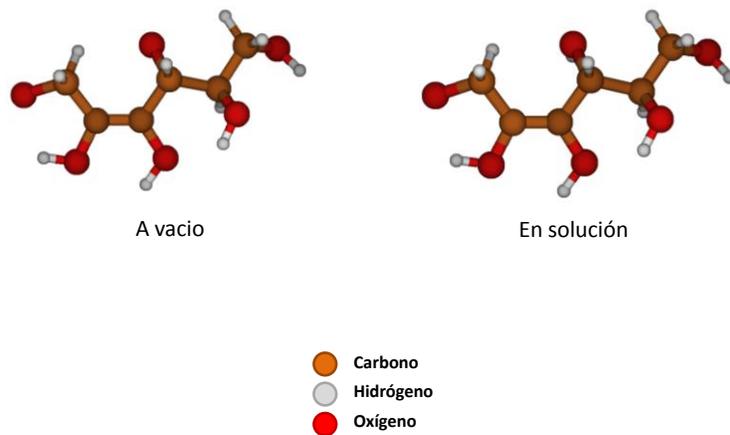


Figura 58. Comparación de geometría de la *cis*-fructuosa (forma enediol) calculada en PM6 (semi-empírico) a vacío y en solución (agua como disolvente)

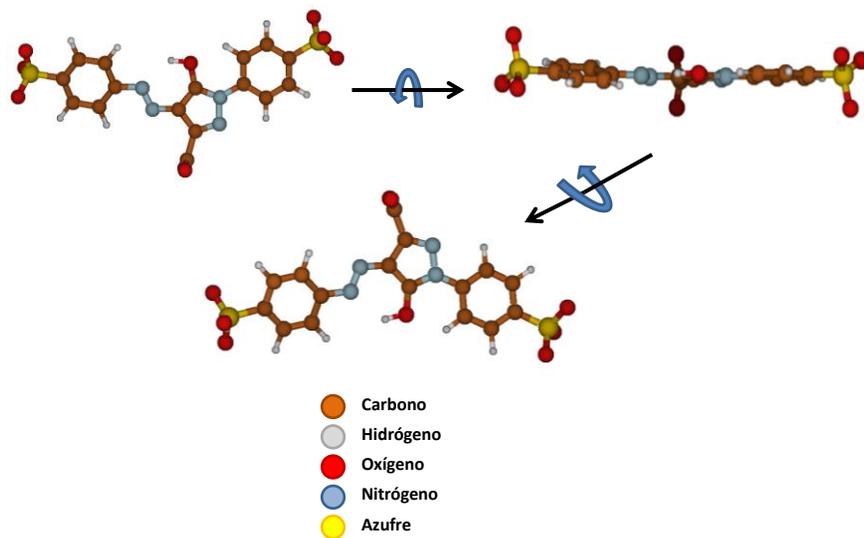


Figura 59. *trans*-Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico)

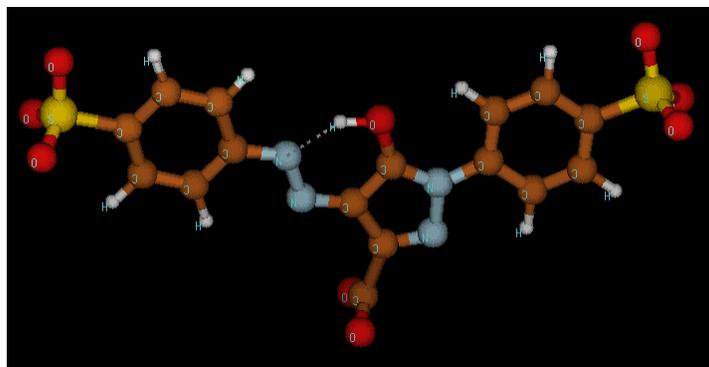


Figura 60. *trans*-Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico)

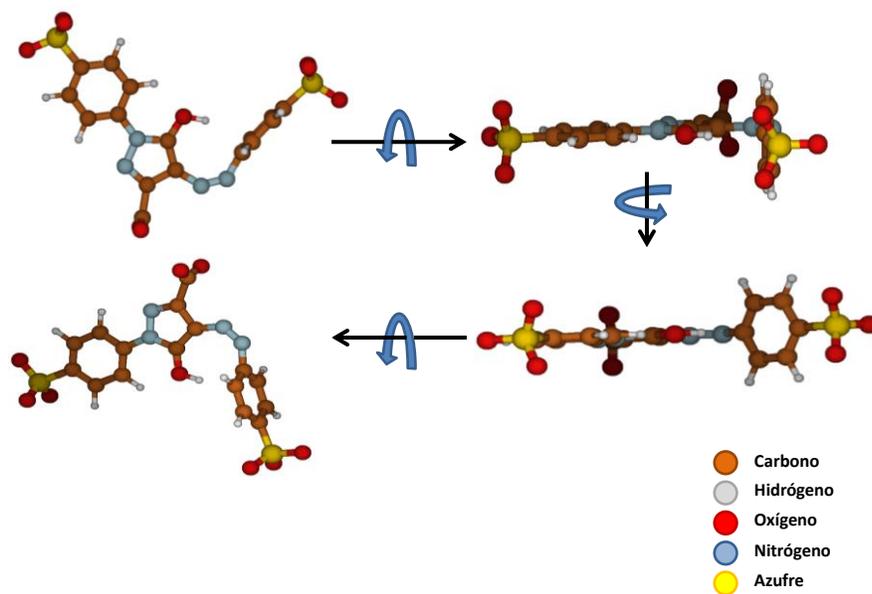


Figura 61. *cis*-Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico)

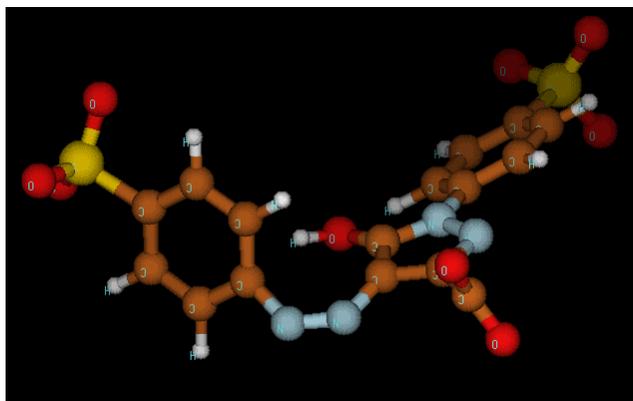


Figura 62. *cis*-Tartrazina geometría calculada en PM6 (semi-empírico)

A partir del cálculo de las estructuras de las sustancias involucradas se construyó la tabla de propiedades resultantes de reactivos y productos

Tabla 8. Resultados termodinámicos de la reacción de Tartrazina con Fructosa

A Vacío								
	Reactivos		Productos		Diferencias			
	Tartrazina <i>Trans</i>	Fructosa Enolica- <i>Cis</i>	Tartrazina Reducida- <i>Trans</i>	Fructosa Oxidada- <i>Cis</i>	Productos-Reactivos			
Energía en Hartrees					Hartrees		kcal/mol	kJ/mol
E	-0.4230558	-0.4122691	-0.4626074	-0.3819676	-0.0092501	ΔE	-5.80453025	-24.2861546
(ZPE)	-0.185108	-0.244821	-0.2026	-0.233231	-0.005902	$\Delta(ZPE)$	-3.70356402	-15.4957119
(Termal Corr)	-0.156989	-0.229752	-0.174138	-0.218544	-0.005941	$\Delta(\text{Termal Corr})$	-3.72803691	-15.5981064
$\Delta H_f(\text{entalpia})$	-0.156044	-0.228808	-0.173194	-0.2176	-0.005942	$\Delta H(\text{entalpia})$	-3.72866442	-15.6007319
$\Delta G_f(\text{Gibbs})$	-0.253683	-0.287762	-0.271058	-0.27783	-0.007443	$\Delta G(\text{Gibbs})$	-4.67055693	-19.5416102

En solución (agua)								
	Reactivos		Productos		Diferencias			
	Tartrazina <i>Cis</i>	Fructosa Enolica- <i>Trans</i>	Tartrazina Reducida- <i>Cis</i>	Fructosa Oxidada- <i>Trans</i>	Productos-Reactivos			
Energía en Hartrees					Hartrees		kcal/mol	kJ/mol
E	-0.4176775	-0.4216028	-0.4578851	-0.3844568	-0.0030616	ΔE	-1.92118462	-8.03823643
(ZPE)	-0.179842	-0.253401	-0.198246	-0.235218	-0.000221	$\Delta(ZPE)$	-0.13867971	-0.58023591
(Termal Corr)	-0.151685	-0.238689	-0.169785	-0.220754	-0.000165	$\Delta(\text{Termal Corr})$	-0.10353915	-0.4332078
$\Delta H_f(\text{entalpia})$	-0.150741	-0.237745	-0.168841	-0.21981	-0.000165	$\Delta H(\text{entalpia})$	-0.10353915	-0.4332078
$\Delta G_f(\text{Gibbs})$	-0.248723	-0.295618	-0.266414	-0.279476	-0.001549	$\Delta G(\text{Gibbs})$	-0.97201299	-4.06690235

En solución (agua)								
	Reactivos		Productos		Diferencias			
	Tartrazina <i>Trans</i>	Fructosa Enolica- <i>Cis</i>	Tartrazina Reducida- <i>Trans</i>	Fructosa Oxidada- <i>Cis</i>	Productos-Reactivos			
Energía en Hartrees					Hartrees		kcal/mol	kJ/mol
E	-0.8687588	-0.4359215	-0.9124496	-0.4020778	-0.0093761	ΔE	-5.88359651	-24.6169678
(ZPE)	-0.632605	-0.269664	-0.654177	-0.253801	-0.005357	$\Delta(ZPE)$	-3.36157107	-14.0648134
(Termal Corr)	-0.60414	-0.254462	-0.625699	-0.239259	-0.005945	$\Delta(\text{Termal Corr})$	-3.73054695	-15.6086084
$\Delta H_f(\text{entalpia})$	-0.603196	-0.253518	-0.624755	-0.238315	-0.005945	$\Delta H(\text{entalpia})$	-3.73054695	-15.6086084
$\Delta G_f(\text{Gibbs})$	-0.698011	-0.312468	-0.718103	-0.296971	-0.004655	$\Delta G(\text{Gibbs})$	-2.92105905	-12.2217111

En solución (agua)								
	Reactivos		Productos		Diferencias			
	Tartrazina <i>Cis</i>	Fructosa Enolica- <i>Trans</i>	Tartrazina Reducida- <i>Cis</i>	Fructosa Oxidada- <i>Trans</i>	Productos-Reactivos			
Energía en Hartrees					Hartrees		kcal/mol	kJ/mol
E	-0.8727513	-0.4315205	-0.9124496	-0.3972058	-0.0058546	ΔE	-3.67382005	-15.3712631
(ZPE)	-0.636221	-0.265341	-0.654177	-0.249126	-0.002093	$\Delta(ZPE)$	-1.31337843	-5.49517535
(Termal Corr)	-0.607974	-0.250154	-0.625699	-0.23454	-0.002522	$\Delta(\text{Termal Corr})$	-1.58258022	-6.62151564
$\Delta H_f(\text{entalpia})$	-0.607029	-0.24921	-0.624755	-0.233596	-0.002523	$\Delta H(\text{entalpia})$	-1.58320773	-6.62414114
$\Delta G_f(\text{Gibbs})$	-0.700913	-0.307959	-0.718103	-0.292522	-0.001693	$\Delta G(\text{Gibbs})$	-1.06237443	-4.44497462

De acuerdo con los principios de la termodinámica aplicados a reacciones químicas, la diferencia de energía entre los productos y los reactivos indican la factibilidad del proceso. La magnitud y el signo de la diferencia de energía relacionan el que un proceso se lleve a cabo o no y cuanta energía necesitará o liberará al realizarse. Una diferencia negativa indica que el proceso es factible y que liberará energía. Mientras más negativo el proceso es más posible de llevarse a cabo.

Se realizó el análisis en condiciones de vacío y en solución acuosa, que es lo más cercano a lo real. En todos los cálculos se puede apreciar el valor negativo de la energía libre lo cual indica la factibilidad de llevarse a cabo las reacciones propuestas. Para la reacción entre

Tartrazina *cis* y Fructosa enólica *cis* presentan energía libre similar entre el cálculo en vacío y en solución acuosa. Para el caso de la Tartrazina *trans*, tanto para vacío como en solución se pudo constatar una mayor energía libre que para la versión *cis*.

Así, para la reacción del colorante Tartrazina con fructosa, se concluye que tanto la reacción de Tartrazina *trans* como la *cis*, son factibles desde el punto de vista termodinámico, aunque con mayor preferencia por la forma *trans*.

Capítulo 9. CONCLUSIONES

En el análisis de las marcas de Amaretto en este trabajo, las técnicas de HPLC y de espectrofotometría en el intervalo de la luz visible demostraron ser aptas, mientras que cromatografía en capa fina no fue de utilidad para el análisis de los colorantes debido a la interferencia por parte de los edulcorantes.

La cinética de decoloración fue examinada para un licor tipo Amaretto, llevando a las siguientes conclusiones. Para que la pérdida de color se produzca, la luz es un requisito absoluto, y un mayor valor de irradiación conduce a una cinética de decoloración más rápida. Comparando las formulaciones preparadas de Amaretto, la que contiene sacarosa en lugar de la Fructosa 42 usada en la formulación comercial, muestra mayor estabilidad del color, mientras que la formulación sin edulcorante añadido fue la más estable. Por lo tanto, los resultados apuntan a la necesidad de proteger este licor de la luz, y sugieren la sustitución de jarabe de Fructosa 42 por sacarosa como una mejora en la formulación del producto comercial. Obviamente, comparando la rápida degradación observada en el presente estudio en cubetas de 1 cm, el licor debe mostrar mayor resistencia del color a la luz en su presentación habitual, la típica botella de Amaretto aplanada con un espesor de la capa líquida de varios centímetros, incluso en condiciones de luz solar (por ejemplo de 500 W/m^2).

Claramente se observa la decoloración del Amaretto de marca A (que contiene Fructosa 42) y la no decoloración de las marcas B y C (que contienen sacarosa). Sin embargo, los resultados más claros se obtuvieron con las soluciones de ensayo que contenían los colorantes azoicos en solución de alcohol y agua, en presencia de los diferentes sacáridos, proporcionados en forma pura. Aquí se observó que los monosacáridos reductores fueron efectivos en la fotorreacción de cualquiera de los dos colorantes, con la D-fructosa actuando claramente más fuerte que la D-glucosa, en este sentido. No se observó reacción con el disacárido no reductor, la sacarosa, o en ausencia de cualquier sacárido.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son de interés desde el punto de vista químico, ya que la fotorreducción de compuestos azoicos con azúcares reductores, hasta ahora no ha sido reportada. Más allá de eso, los resultados son importantes desde un punto

de vista industrial, puesto que los colorantes azoicos, los azúcares, y la luz a menudo coinciden en la fabricación o almacenamiento de alimentos y bebidas, presentando la posibilidad de decoloración como se documenta en el presente trabajo. El caso aquí examinado puede servir como un recordatorio de que la sustitución de edulcorantes establecidos, tales como la sacarosa, por los modernos edulcorantes industriales, como el jarabe de Fructosa 42, que son químicamente diferentes, requiere caso por caso de una cuidadosa consideración.

Capítulo 10. REFERENCIAS

Arnaud SJ, David AW, Douglas JD. 2000. Food Additives. En: Kirk RE, Othmer DF, editors. Encyclopedia of Chemical Technology. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. Vol. 12, pág. 29-73.

Arroyave Rojas JA, Garcés LF, Arango AJ, Agudelo CM, Martínez CA. 2008. Degradación del colorante Tartrazina mediante fotocátalisis homogénea empleando lámpara de luz ultravioleta. Producción más Limpia, Enero – Junio 3:1.

Baird C. 2001. Química Ambiental. Reverté. Barcelona, pág. 33 y 91.

Baxter JH. 1995. Free amino acid stability in reducing sugar systems. J. Food Sci. 60(2):405-408.

Bechthold T, Burtscher E, Turcanu A. 2001. Cathodic decolourization of textile waste water containing reactive dyes using a multi-cathode electrolyser. J. Chem. Technol. Biotechnol. 76:303-311.

Bedinghaus AJ, Ockerman HW. 1995. Antioxidative Maillard Reaction Products from Reducing Sugars and Free Amino Acids in Cooked Ground Pork Patties. J. Food Sci. 60(5):992-995.

Bhushan B, Halasz A, Hawari J. 2006. Effect of Iron(III), humic acids and anthraquinone-2,6-disulfonate on biodegradation of cyclic nitramines by *Clostridium* sp. EDB2. J. Appl. Microbiol. 100: 555-563.

Boyd Gerard D. 2006. Venerable Liqueurs. Wine review on line.com. Jan 24. www.winereviewonline.com/boyd_on_liqueurs.cfm#. Consultado (11-03-2011)

Braude EA, Linstead RP, Mitchell PWD, Wooldridge KRH. 1954. Hydrogen Transfer. Part VIII. Metal-catalysed Transfer-hydrogenation of Miscellaneous Acceptors. J. Chem. Soc. 1954:3595-3598.

- Brode WR, Gould JH, Wyman GM. 1952. The Relation between the Absorption Spectra and the Chemical Constitution of Dyes. XXV. Phototropism and *cis-trans* Isomerism in Aromatic Azo Compounds. J. Amer. Chem. Soc. 74:4641-4646.
- Brown D, Laboureur P. 1983. The degradation of dyestuffs: Part 1 – Primary biodegradation under anaerobic conditions. Chemosphere 12(3):397-404.
- Calvo C. y Durán L. 2005. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Temas en Tecnología de Alimentos. Óptica y Color. México, D.F. AlfaOmega. IPN, pág. 157-160.
- Carvajal Barba, M. 2004. Enlace y Estereoquímica en Compuestos Monovalentes de Cu, Ag, Au. Tesis Doctoral por la Universidad de Barcelona.
- Castañeda-Olivares F, Pless RC, González-Jasso E. 2010. Effect of Light and Sweeteners on Color in an Amaretto-Type Liqueur. J. Food Sci. 75(9):C766-C773.
- Chen BY. 2002. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. Process Biochemistry 38:437-446.
- Chung KT, Fulk GE, Egan M. 1978. Reduction of Azo Dyes by Intestinal Anaerobes. Appl. Env. Microbiol. 35:558-562.
- Combes RD, Haveland-Smith RB. 1982. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. Mutation Res. 98:101-248.
- Cuevas G, Cortés F. 2003. Introducción a la Química Computacional. Sección de Obras de Ciencia y Tecnología. La Ciencia en el Nuevo Milenio. Fondo de Cultura Económica. México. 1ª ed. Pág 15-17.
- Daneshvar N, Salari D, Khataee AR. 2003. Photocatalytic degradation of azo dye Acid Red 14 in water: investigation of the effect of operational parameters. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry 157:111-116.

Daneshvar N, Aleboyeh A, Khataee AR. 2005. The evaluation of electrical energy per order (E_{E0}) for photooxidative decolorization of four textile dye solutions by the kinetic model. *Chemosphere* 59:761-767.

Delée W, O'Neill C, Hawkes FR, Pinheiro HM. 1998. Anaerobic Treatment of Textile Effluents: a Review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73:323-335.

Desrosier N. 1989. Conservación de Alimentos. 2ª ed. Compañía Editorial Continental. México, pág. 56-60.

Dosa P, Kronish I, McCallum J, Schwartz J, Barden MC. 1996. Titanium Complex-Catalyzed Borohydride Reduction of Azobenzenes. *J. Org. Chem.* 61:4886-4887.

dos Santos AB, Cervantes FJ, van Lier JB. 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Biores. Technol.* 98: 2369-2385.

Egan H, Kirk R, Sawyer R. 1988. Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental, México, pág. 59-61.

Fernández Sanchis E. 2006. Zweistufiger Abbau aromatischer Azoverbindungen durch elektrochemische Reduktion und Sorption. [Doctoral thesis]. Erlangen-Nürnberg, Germany: Friedrich-Alexander-Universität. 120 páginas. Disponible en: <http://www.opus.ub.uni-erlangen.de/opus/volltexte/2006/466/Elvira.Fern%20E1ndez-Dissertation.pdf>. (Consultado 20-04-2010).

Fessenden RJ, Fessenden JS, Logue MW. 1998. Organic Chemistry. Brooks Cole Editor, pág. 568-573.

Fourth Annual Review of Carcinogens, NTP 85-002, 1985, pág. 34.
<http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=72016262-BDB7-CEBA-FA60E922B18C2540>.
(Consultado 15-05-2010).

Franciscon E, Zille A, Dias Guimaro F, Ragagnin de Menezes C, Durrant LR, Cavaco-Paulo A. 2009. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae*

strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63(3):280-288.

Gabor G, Bar-Eli KH. 1968. Conformational Isomerism of 1,1'-Disubstituted Azo Compounds. *J. Phys. Chem.* 72:153-155.

Gerasimov AV. 2000. Qualitative and Quantitative Treatment of Thin-Layer Chromatograms of Incompletely Separated Synthetic Food Colors. *J. Analytical Chem.* 55(12):1161-1165.

González LV, Escamilla EM. 2008. Biodegradación anaerobia de colorantes azoicos textiles usando carbón activado. *Biotecnología* 12(3):34-48.

Gordon HT, Bauernfeind JC. 1982. Carotenoids as food colorants. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18(1):59-62.

Gowda S, Abiraj K, Gowda DC. 2002. Reductive cleavage of azo compounds catalyzed by commercial zinc dust using ammonium formate or formic acid. *Tetrahedron Letters* 43(7):1329-1331.

Guthrie RD. 1974. *Introduction to Carbohydrate Chemistry*, 4a ed. Oxford Clarendon Press, pág. 123-125.

Hartman CP, Andrews AW, Chung KT. 1979. Production of a Mutagen from Ponceau 3R by a Human Intestinal Anaerobe. *Infection and Immunity* 23(3):686-689.

Henkel, J. 1993. From shampoo to cereal: seeing to the safety of color additives. *FDA Consumer Magazine*. December.

Herrera C, Bolaños N, Lutz G. 2003. *Química de Alimentos: Manual de Laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 1ª ed, pág. 4-7.

Hu TL. 2001. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. *Water Sci. Technol.* 43:261-269.

Hurd CD, Whistler RL. 2000. Carbohydrates. En: Kirk RE, Othmer DF, editors. Encyclopedia of Chemical Technology. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. vol. 4, pág. 696-712.

Jain R, Bhargava M, Sharma N. 2003. Electrochemical Studies on a Pharmaceutical Azo Dye: Tartrazine. Industrial & Engineering Chemistry Research 42:243-247.

Jenkins R. 2001. Los barones del azúcar. Biodiversidad. Sustento y Culturas. Grupo ETC México. No. 30. Octubre.

Jnaneshwara GK, Sudalai A, Deshpande VH. 1998. Palladium-catalysed Transfer Hydrogenation of Azobenzenes and Oximes using Ammonium Formate. J. Chem. Research (S) 1998:160-161.

Kitagawa M, Fan H, Konagaya N, Shibatani S, Kashimura N, Kurane R, Tokiwa Y. 2001. Generation of Hydroxyl Radicals from Polymer Containing Reducing Sugar Branches in the Presence of Hydrogen Peroxide. Macromolecular Chemistry and Physics 202(2):231-235.

Koppes WM, Moran JS, Oxley JC, Smith JL. 2008. Azo bond hydrogenation with hydrazine, R-NHNH₂, and hydrazobenzene. Tetrahedron Letters 49:3234-3237.

Kunitou K, Maeda S, Hongyou S, Mishima K. 2002. Effect of Glucose on Photocatalytic Decolorization of Dyes by TiO₂. Can. J. Chem. Eng. 80:208-213.

Lenherr A, Mabry TJ, Gretz MR. 1987. Differentiation between glucose, mannose, allose, and galactose in plant glycosides by high-performance liquid chromatographic analysis. J. Chromatog. 388:455-458.

Li T, Guthrie JT. 2010. Colour Removal from Aqueous Solutions of the Reactive Azo Dye Remazol Black B Using the Immobilised Cells (*Shewanella* Strain J18 143)-Cellulose-g-co-Monomer System. J. Water Res. Prot. 2:77-84.

López Cisneros R, Gutarra Espinoza A, Litter MI. 2002. Photodegradation of an azo dye of the textile industry. Chemosphere 48:393-399.

- Macwana SR, Punj S, Cooper J, Schwenk E, John GH. 2010. Identification and Isolation of an Azoreductase from *Enterococcus faecium*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 12:43-48.
- Macy, R. 1975. *Química Orgánica Simplificada*. Ed. Reverté. Barcelona. 2ª ed, pág. 419.
- Madrid Vicente Antonio. 1993. *Manual de Industrias Alimentarias*. Antonio Madrid Vicente Ediciones. Madrid, España 2ª ed, pág. 124.
- Márquez G, Añon MC. 1986. Influence of Reducing Sugars and Amino Acids in the Color Development of Fried Potatoes. *J. Food Sci.* 51(1):157-160.
- Mezőhegyi G, Bengoa C, Stuber F, Font J, Fortuny A, Fabregat A. 2007. Innovative reactor design for anaerobic decolorization of azo dyes. *Proceedings of the 10th International Conference on Environmental Science and Technology*, Kos, Greece, September 2007.
- Mezohegyi G, Bengoa C, Stuber F, Font J, Fabregat A, Fortuny A. 2008. Novel bioreactor design for decolourisation of azo dye effluents. *Chemical Engineering Journal* 143:293-298.
- Minioti KS, Sakellariou CF, Thomaidis NS. 2007. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta* 583(1):103-110.
- NOM-142-SSA1-1995, Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- Noonan JE, Meggos H. 1980. Synthetic food colours. *CRC Handbook of Food Additives*, 2a ed. vol. II. Furia TE, pág. 339-383.
- Ozdemir G, Yasa İ, Pasarbası B, Ersoy E, Karaboz I, Basaran B, Oral Bitlisli B, Sari O. 2006. Decolorization of the leather industry dyes by newly isolated bacterial strains. IULTCS II. Eurocongress “Innovation and Technologies for the Future of the Global Leather Industry”, Istanbul, Turkey, 2006.

- Ozdemir G, Pasarbasi B, Kocyigit A, Ersoy Omeroglu E, Yasa I, Karaboz I. 2008. Decolorization of Acid Black 219 by *Vibrio harveyi* TEMS1, a newly isolated bioluminescent bacterium from Izmir Bay, Turkey. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1375-1381.
- Pagga U, Brown D. 1986. The degradation of dyestuffs: Part II: Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* 15(4):479-491.
- Parac-Osterman D, Grancarić AM, Sutlovic A. 2004. Influence of chemical structure of dyes on decolouration effects. AIC 2004 Color and Paints, Proceedings of the Interim Meeting of the International Color Association, pág. 179-182.
- Pasha MA, Nanjundaswamy, HM. 2005. Uncatalyzed Reductive Fission of Azoarene to Aminoarene(s) by Hydrazine Hydrate. *Synthetic Communications* 35:897-900.
- Puzenat E, Lachheb H, Karkmaz M, Houas A, Guillard C, Herrmann JM. 2003. Fate of nitrogen atoms in the photocatalytic degradation of industrial (congo red) and alimentary (amaranth) azo dyes. Evidence for mineralization into gaseous dinitrogen. *Int. J. Photoenergy* 5:51-58.
- Rafii F, Cerniglia CE. 1995. Reduction of Azo Dyes and Nitroaromatic Compounds by Bacterial Enzymes from the Human Intestinal Tract. *Env. Health Persp.* 103(S5):17-20.
- Restrepo M. 2007. Sustitución de colorantes en Alimentos. *Revista Lasallista de Investigación* 4(1):35-39.
- Reutergårdh LB, Iangphasuk M. 1997. Photocatalytic decolourization of reactive azo dye: a comparison between TiO₂ and CdS photocatalysis. *Chemosphere* 35(3):585-596.
- Revilla I, González-San José ML. 2003. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *Int. J. Food Sci. Techn.* 38:29-36.
- Ricker R. 2002. FD & C. Colors. Application Food Analysis. Agilent Technologies.

Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM, Willett WC. 2008. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Pública Mexicana* 50:173-195.

Rodríguez M, Sadler GD, Sims CA, Braddock RJ. 1991. Chemical Changes during Storage of an Alcoholic Orange Juice Beverage. *J. Food Sci.* 56:475-479.

Rollas S. 2010. Reduction of aromatic and heteroaromatic azo compounds with hydrazine hydrate. *Marmara Pharmaceutical Journal* 14:41-46.

Ross KD. 1975. Reduction of the Azo Food Dyes FD&C Red 2 (Amaranth) and FD&C Red 40 by Thermally Degraded D-Fructose and D-Glucose. *J. Agric. Food Chem.* 23(3):475-478.

Ross WCJ, Warwick GP. 1955. Reduction of cytotoxic azo compounds by hydrazine and by the xanthine oxidase-xanthine system. *Nature* 176:298-299.

Rossi, JP. 2007. La combinación de los azúcares con las biomoléculas, desde la cocina al organismo. *Medicina. Universidad de Buenos Aires.* 67:161-166.

Ruiz Hernández M. 2004. Pérdida de color en vino durante el proceso DML. Hipótesis y verificación. *La Semana Vitivinícola, España.*

Sakalis A, Mpoulmpasakos K, Nickel U, Fytianos K, Voulgaropoulos A. 2005. Evaluation of a novel electrochemical pilot plant process for azodyes removal from textile wastewater. *Chem. Eng. J.* 111:63-70.

Sakalis A, Fytianos K, Nickel U, Voulgaropoulos A. 2006. A comparative study of platinised titanium and niobe/synthetic diamond as anodes in the electrochemical treatment of textile wastewater. *Chemical Engineering Journal* 119:127-133.

Schwartz SJ, Lorenzo TV. 1990. Chlorophylls in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Technol.* 29:1-17.

Smith, S. J. Sutcliffe B. T. (1997). The development of Computational Chemistry in the United Kingdom. *Reviews in Computational Chemistry* 70: 271 - 316.

- Simonov AN, Lavrichev AV. 1999. Dynamics of photoinduced processes in liquid-crystal polymer films containing azo compounds. *Quant. Electr.* 29(7):644-648.
- Simpson KL. 1982. Carotenoid pigments in seafood. En: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, Martin RE, Flick GJ, Hebard CE, and Ward DR, Eds., AVI Publishing Company, Inc., pág. 115-136.
- Singh AK, Rahmani S, Singh B, Singh RK, Singh M. 2004. *J. Phys. Org. Chem.* 17(3):249-256.
- Solomons, G. 1997. *Fundamentals of Organic Chemistry*, 4th ed., University of South Florida, E.U.A., pág. 356-360.
- Spadaro JT, Isabelle L, Renganathan V. 1994. Hydroxyl Radical Mediated Degradation of Azo Dyes: Evidence for Benzene Generation. *Environ. Sci. Technol.* 28:1389-1393.
- Sridhara MB, Srinivasa GR, Gowda DC. 2004. Reductive Cleavage of Azo Compounds by Zinc and Ammonium Chloride. *Synth. Comm.* 34(8):1441-1446.
- van der Zee FP. 2002. Anaerobic azo dye reduction. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Universidad de Wageningen. Países Bajos, 142 páginas. (Citado en Cervantes FJ. 2008. *BioTecnología* 12(3):6-20).
- von Elbe JH, Schwartz SJ. 1996. Colorants. En: Fennema OR. *Food Chemistry*. 3rd ed. New York. Marcel Dekker, Inc., pág. 703-713.
- Xu XR, Li HB, Wang WH, Gu JD. 2004. Degradation of dyes in aqueous solutions by the Fenton process. *Chemosphere* 57:595-600.
- Zhang, CR, Wang, YL 2003. A Simple and Efficient Method for the Reduction of Azo Compounds. *Synthetic Communications* 33(24):4205-4208.
- Žilić Ž., Blau N., Knob M. 1979. Simple rapid method for the separation and quantitative analysis of carbohydrates in biological fluids. *J. Chromatog.* 164:91-94.
- Zollinger H. 1987. *Color: Chemistry – Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. VCH, New York, pág. 92-102.

PRODUCTOS DE LA TESIS.

Effect of Light and Sweeteners on Color in an Amaretto-Type Liqueur

F. Castañeda-Olivares, R.C. Pless, and E. González-Jasso

Abstract: Studies on the color loss in an amaretto-type liqueur under controlled light conditions showed a clear dependence of the decoloration rate on the light intensity, and complete color stability in the absence of light. The principal sweetener used in the preparation of the liqueur strongly affected the rate of color loss under irradiation, color stability being much greater for the formulations containing sucrose or no added sweetener instead of fructose 42. These differences were more pronounced in experiments conducted with chemically well-defined mixtures that contained either of the 2 azo dyes used in the coloration of the amaretto, tartrazine, and Allura Red, and various alternative sweeteners, in 28% (v/v) ethanol solution: D-fructose and, to a lesser extent, D-glucose, at concentrations of 14% (w/v), were effective in bringing about photodecoloration, while no color loss was detected in the presence of sucrose, or in the absence of any added sugar. The results are interpreted in terms of a redox reaction of reducing sugars with the diarylazo compounds, the function of the light being the conversion of the azo compound from the predominant *trans* configuration to the *cis* configuration, which on geometric grounds lends itself better to a concerted, cyclical redox reaction with the reducing sugar.

Keywords: azo dyes, liqueurs, photodegradation, sweeteners

Practical Application: The present study describes an interaction between azo dyes and reducing sugars under irradiation with light, which results in rapid decoloration. This result is of interest as the coincidence of these 3 factors may occur with some frequency.

Introduction

For beverages, as for foodstuffs, visual appearance is an important determinant for customer acceptance. The visual aspect also functions as an indicator of quality (Arraud and others 2000). Therefore, color stability during storage of the product is a central concern in its manufacture and subsequent handling.

These considerations also apply to amaretto, an almond-flavored liqueur that originated in the Sarorno region of Italy. Its characteristic reddish-brown color is a central attribute recognized and valued by the customer; therefore, the loss of color which this liqueur may undergo during storage represents a major problem. Nowadays this liqueur is produced under the name of amaretto in many countries, often with the use of artificial food dyes, in order to achieve and maintain the desired color. These artificially colored amaretto versions are also prone to color loss during extended periods of storage.

Publications on color development and stability in alcoholic beverages are few: They deal above all with red wines, for instance in the work of Revilla and González-San José (2003) and of Ruiz Hernández (2004), who examined various processes, some of them

of the enzymatic type, involved in the formation as well as the loss of color. In contrast, in the manufacture of liqueurs, no enzymatic processes are involved as they are produced by simple methods such as maceration, infusion, or distillation of various substances, which contain aromatic alcohols, or the addition of aromatic extracts or of artificial essences and flavorings. Publications on color formation and stability in this type of product are scarce; an example is the study by Rodríguez and others (1991), who reported that changes in storage conditions result in differences in color, in an orange-based alcoholic beverage they were studying, without, however, offering a mechanistic rationale for the processes involved.

Azo compounds, widely used in the production of foodstuffs and beverages, are subject to a slow process of decoloration when exposed to light (Von Elbe and Schwartz 1996). It is also known that these compounds can react with reducing agents. As amaretto-type liqueurs generally contain high levels of sweeteners, some of which have reducing groups, and as they often are stored in conditions where exposure to light is possible, it is of interest to understand the effect of light and of sweeteners, acting separately or in conjunction, on the color stability of this type of liqueur. The present work is a study of this type on an amaretto product made in Mexico, which was prompted by a major decoloration problem arising during storage of the liqueur.

Materials and Methods

Materials

Most of the samples used in the present work were provided by a Mexican company, which produces various types of alcoholic

MS 20100606 Submitted 6/2/2010, Accepted 8/30/2010. Author an with Inst. Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Querétaro, Cerro Blanco 141, Querétaro, C.P. 76000, México. Author Castañeda-Olivares is also with Unita. Tecnología de San Juan del Río, Avenida La Palma 125, San Juan del Río, Querétaro, C.P. 76800, México. Direct inquiries to author Castañeda-Olivares (E-mail: ocf@sjro.itesm.mx).

beverages. These samples represent the formulation commercially offered by the company as amaretto liqueur, which contains, as a sweetener, 12% (w/v) fructose 42, that is, an approximately equimolar mixture of fructose and glucose, and alternative formulations: one with sucrose (14%, w/v) in lieu of fructose, the other without any added sweetener. All these formulations contained maltodextrin (3%, w/v) as a thickening agent, tartrazine at 9.8 mg/L, and Allura Red at 3.85 mg/L, as well as alcohol (28%, v/v).

These samples were prepared by the standard procedures employed by the company using their established ingredients: tartrazine and Allura Red from Kerry de México (Pachuca, Hidalgo, Mexico), almond essence and amaretto essence from Robertet (Mexico City, Mexico), and Fructose 42 from Corn Products Ingredients (San Juan del Río, Querétaro, Mexico).

Methods

Analysis of colorants

Chromatographic analysis of the amaretto formulation, as well as of the separate dyes, essentially followed the method of Rucker (2002). It was performed on an Agilent 1100 chromatograph, using a Rapid-Resolution (5 μ particle size) Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 \times 150 mm; Agilent, Santa Clara, Calif., U.S.A.). Elution was at 25 °C with a linear binary gradient (from 17% to 100% solvent B per 12 min) formed from solvents A and B, where A was 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., U.S.A.) in high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade water (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, U.S.A.), adjusted to pH 4.4 with triethylamine (Sigma-Aldrich), and B was HPLC-grade methanol (Sigma-Aldrich). The flow rate was 1 mL/min, and the eluate was monitored by absorbance measurement at 428 nm and 502 nm, the wavelengths of maximum absorbance of tartrazine and Allura Red, respectively. Sample volumes loaded were 20 μ L. Amaretto samples were 10% (v/v) dilutions of the amaretto formulation in HPLC-grade water. Allura Red (purity 80%) and tartrazine (purity 99%) were obtained from Sigma-Aldrich and Fluka Analytical, respectively, and used for HPLC analysis in aqueous solutions at concentrations of 0.38 mg/L and 0.98 mg/L, respectively. In several instances, chromatographic analysis of the same time point was performed in triplicate, with variation of maximally 3%.

Analysis of sweeteners

The sugars contained in the amaretto samples were evaluated according to the method of Lamberth and others (1987) by HPLC on an Aminex HPX-87P column (7.8 \times 300 mm) from Bio-Rad (Hercules, Calif., U.S.A.), using isocratic elution with HPLC-grade water, at 80 °C and a flow rate of 0.5 mL/min. Monitoring was by refractive index measurement. Samples were prepared as a 20% (v/v) dilution of the amaretto formulation in HPLC-grade water, and 20- μ L aliquots were injected. Here, again, triplicate samples showed variation of less than 3%.

Kinetics experiments

Decoloration kinetics experiments were performed with 3-mL liquid samples held in 4-mL quartz cuvettes with a 1-cm pathlength, hermetically closed with a lid. Irradiation of these samples was carried out in a chamber, with internal dimensions of 60 \times 30 \times 40 cm, whose inner surfaces were painted black. The light source was an MR16/50W/C-130V halogen lamp (Teco Lita, Mexico City, Mexico), placed at a distance

of 15 cm, 20 cm, or 30 cm from the samples, corresponding to incident fluxes of 841 W/m², 652 W/m², and 290 W/m², respectively, as determined with a pyroelectric radiometer (Laser Probe, model RSP-590). Irradiation times used were 0, 6, 12, 24, 48, 96, 192, and 360 h. After different irradiation times, absorption spectra were recorded between 350 nm and 900 nm, on a Perkin Elmer Lambda 25 UV/visible spectrophotometer, against a water blank. Also, 30- μ L aliquots were removed at that time for HPLC analysis.

Data analysis

The raw data from the kinetic runs were analyzed using the Origin 8 software.

Results and Discussion

Kinetics experiments with the different amaretto formulations

Figure 1 shows the absorption spectra of the commercial amaretto formulation immediately after its preparation and after 6-mo storage in the dark at 25 °C. Similarly, mixtures formulated with sucrose or without any added sweetener also showed no spectral changes after 6 mo in the dark (less than the differences seen in Figure 1). In all cases, the spectra at zero time and after 6 mo were virtually superimposable, indicating that, regardless of the sweetener employed, these formulations suffered no significant decoloration under these conditions.

Irradiation experiments were carried out with the various formulations of the liqueur, at irradiances of 841, 652, and 290 W/m². Figure 2 shows representative results, obtained at 652 W/m², for samples of the commercial formulation of the amaretto, prepared with fructose 42, and the alternative formulations containing sucrose at 14% (w/v) instead of fructose 42, or without added sweetener, respectively. For the case of the commercial formulation (Figure 2A), the absorbance spectra show, both at 428 nm and 502 nm (the wavelengths of maximal absorbance of tartrazine and Allura Red, respectively), a steady decrease over the total irradiation time examined, which was from 0 to 360 h. Qualitatively similar results were obtained in the case of the formulation containing sucrose instead of fructose 42 (Figure 2B), with the difference that for identical irradiation times, the relative

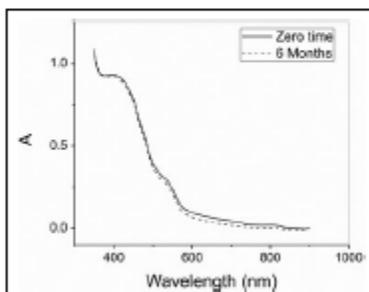


Figure 1—Absorption spectra of the commercial amaretto formulation at zero time and after 6-mo storage at room temperature in the dark.

Decoloration of an amaretto liqueur ...

decrease in A_{428} and A_{502} was less than observed in the case of the commercial formulation. The spectra obtained upon irradiation of the sample formulated without added sweetener (Figure 2C) again show a monotonous decrease in A_{428} and A_{502} over time, indicating, upon comparison for equal irradiation times, even slower kinetics of photodegradation.

Comparative time curves for the degradation, at 652 W/m^2 , of the 3 alternative amaretto formulations are shown in Figure 3A

and B. For each of the 2 wavelengths examined (428 and 502 nm, respectively), the decrease in absorbance was much faster for the formulation containing Fructose 42 than for the formulation with sucrose, which in turn photodegraded much more rapidly than the formulation without added sweetener.

The corresponding irradiation experiments were also performed with these same formulations at irradiances of 841 and 290 W/m^2 (spectra not shown). In all cases, the time points obtained for A_{428} and A_{502} were evaluated by a simple single-exponential fit to curves of the general form:

$$A = A_0 e^{-kt}$$

where A is the absorbance (at 428 nm or 502 nm) at time t , A_0 is the absorbance at zero time, and k is the 1st-order rate constant for the decay process. As an example, Figure 4 shows the fit for the case of the photodegradation, at 652 W/m^2 , of the sample formulated with sucrose, followed at 428 nm.

These exponential fits gave, for each case, values of A_0 and k which are summarized in Table 1. The Table also shows, for each of the fits, the adjusted coefficient of determination (adjusted R^2) and, for easier interpretation, the half-times of the decay process observed, along with the error associated with these half-times.

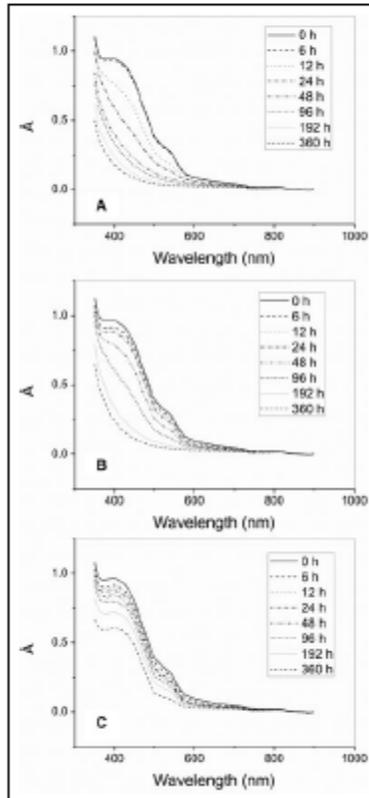


Figure 2—Absorption spectra obtained after different times of irradiation at 652 W/m^2 for the following amaretto formulations: (A) with fructose 42 (commercial amaretto formulation), (B) with sucrose, and (C) without added sweeteners.

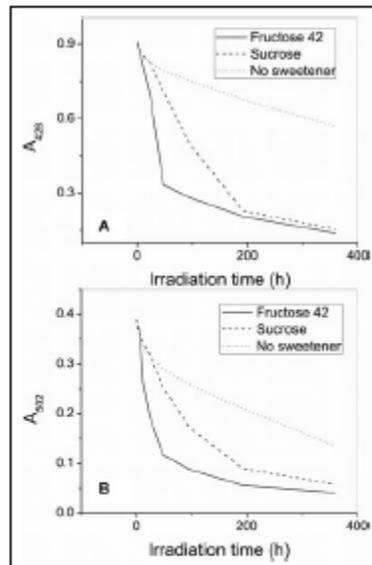


Figure 3—Time progression curves for the irradiation of the various amaretto formulations at 652 W/m^2 , followed at 428 nm (A) and at 502 nm (B).

as calculated by the fitting algorithm. The quality of the fits is generally good, with values of adjusted R^2 always above 0.90, and in most instances much higher. The errors associated with the half-times are maximally 23%, and in most instances much lower.

Comparing the 1st-order rate constants k , we can observe the following trends:

- Comparing the same type of reaction, the values of k rise with increasing irradiance, as expected for a photo-reaction.
- In comparable experiments, the decay rate constants observed for A_{428} and for A_{502} are similar, though generally the values of k are somewhat higher for the latter case, indicating that in all of these conditions, Allura Red is somewhat more sensitive than tartrazine.
- Under comparable conditions, the rate constants decrease in the sequence: commercial formulation with fructose 42—formulation with sucrose—formulation without added sweetener.

The fact that, for tartrazine as for Allura Red, the decoloration reaction is favored by fructose 42 (a mixture of the reducing

monosaccharides fructose and glucose), in preference over sucrose (a non-reducing disaccharide), suggests that the reducing groups of these monosaccharides are involved in the reaction. The degradation of azo compounds through reduction by microorganisms or by azoreductases derived from them is well known (Chung and others 1978; Rafii and Corniglia 1995; Dolé and others 1998; Hu 2001; Mezibugyi and others 2007; Li and Gathrie 2010; Macwana and others 2010), but there are also reports on the cathodic reduction of these compounds in electrolytic cells (Sakalis and others 2005; Fernández Sanchez 2006), as well as on the chemical reduction by reagents such as zinc dust (Sridhara and others 2004) or hydrazine (Rollar 2010). However, the reduction of azo dyes by reducing sugars has hitherto not been reported.

The difference in reactivity between reducing monosaccharides and non-reducing sucrose in this decoloration of the azo dyes may in fact be even larger than seen in these comparisons between different formulations, as the samples provided by the amaretto producer contained in all cases a significant amount of malto-dextrin, which would be reactive through its reducing terminals. It is also possible that other components of the formulations, in particular, the essences added for taste and aroma may contain compounds that could participate in the reaction.

Kinetics experiments with chemically defined dye solutions

For the reasons explained above, it was deemed of interest to examine, under irradiation, the interaction of the various sweeteners with the azo dyes in chemically well-defined mixtures, but otherwise under conditions similar to those existing in the case of the amaretto formulations. Thus, the solvent used was ethanol-water (28:72, v/v), and the sugars employed, which were of reagent grade, were present in similar concentrations as were used in the case of the amaretto samples (14% D-fructose, 14% D-glucose, 14% sucrose). Also, tartrazine and Allura Red reagents were used in concentrations similar to those present in the amaretto formulations.

Figure 5A shows the progression of the absorbance spectra for the reaction mixture containing D-fructose and Allura Red, irradiated at room temperature at 652 W/m². There is a continuous decrease of A_{502} over time, and the band has virtually disappeared after 192 h. A similar effect was observed in the reaction mixture containing tartrazine and D-fructose (Figure 5B), but with slower kinetics, as considerable absorbance at 428 nm was still evident after 360 h of irradiation. A much slower, but still significant, decoloration was observed for the mixture containing Allura Red and

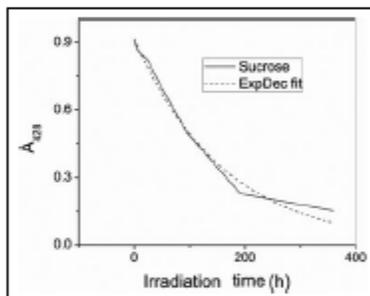


Figure 4—Time progression curve for the irradiation at 652 W/m² of the amaretto formulation with sucrose, along with the 1st-order decay fit.

Table 1—Kinetic parameters obtained from the exponential fit of the irradiation results with the different amaretto formulations.

Formulation	Irradiance Wavelength	841 W/m ²		652 W/m ²		290 W/m ²	
		428 nm	502 nm	428 nm	502 nm	428 nm	502 nm
With fructose 42	A_0	0.891	0.574	0.903	0.579	0.909	0.570
	k (h ⁻¹)	0.0198	0.0218	0.0129	0.0132	0.0037	0.0046
	Adj. R ²	0.902	0.917	0.901	0.920	0.972	0.993
	$t_{1/2}$ (h)	35.0	31.8	53.6	52.5	187	151
	$(t_{1/2})_{max}$ (%)	±2.3%	±2.2%	±2.3%	±2.0%	±9%	±5%
With sucrose	A_0	0.881	0.568	0.917	0.579	0.909	0.582
	k (h ⁻¹)	0.0077	0.0074	0.0062	0.0076	0.0023	0.0039
	Adj. R ²	0.982	0.989	0.985	0.985	0.995	0.992
	$t_{1/2}$ (h)	89.5	93.4	112	91.7	296	178
	$(t_{1/2})_{max}$ (%)	±9%	±7%	±8%	±8%	±3%	±5%
Without added sweetener	A_0	0.893	0.525	0.866	0.553	0.970	0.585
	k (h ⁻¹)	0.0053	0.0065	0.0012	0.0029	0.0007	0.0012
	Adj. R ²	0.931	0.999	0.954	0.951	0.940	0.911
	$t_{1/2}$ (h)	130	106	554	242	949	558
	$(t_{1/2})_{max}$ (%)	±17%	±13%	±9%	±11%	±11%	±13%

D-glucose (Figure 5C). In the irradiation of other test mixtures examined (tartrazine + glucose; Allura Red + sucrose; tartrazine + sucrose; Allura Red or tartrazine without any added sugar), decoloration was minimal or undetectable: in all cases, a decrease of less than 4% was seen at 502 nm or 428 nm, respectively, over a 360-h irradiation time (spectra not shown).

Figure 6A and B show the behavior, over time, of A_{502} and A_{428} , in these experiments. The much higher photodegradative activity of fructose, compared to the other conditions, is evident. The other aspect that stands out is the fact that the degradation of

the azo dyes does not follow simple 1st-order decay kinetics, a fact that was already apparent from simple inspection of the spectra shown in Figure 5A and B. It is seen that a period of slow decrease in the maximal absorbance is followed by a much more rapid phase of decoloration.

On the assumption that this effect might be caused by internal shadowing of the sample, the experiments involving the combinations (Allura Red + D-fructose) and (tartrazine + D-fructose) were repeated under identical conditions, with the difference that they were conducted in thin quartz cells, with a pathlength of 0.1 cm, while all other experiments in this study used 1-cm cells.

Figure 7A and B show that under these conditions, the reactions followed more normal decay kinetics, with a reasonable fit to a 1st-order exponential decay, though the quality of the data is obviously poor due to the low absorbance signal obtained under those conditions. These results bear out that the unusual kinetics observed in the experiments conducted in the 1-cm cells were, indeed, due to the internal-shadowing effect.

Analysis of the reaction mixtures by HPLC

Analysis of the sugars in the commercial amaretto formulation by HPLC showed 3 main bands in the refractive-index trace, centered at 12.5 min, 16.7 min, and 19.0 min retention times (Figure 8A). The 1st and 3rd of these bands were interpreted as glucose and fructose, respectively, on the basis of these retention

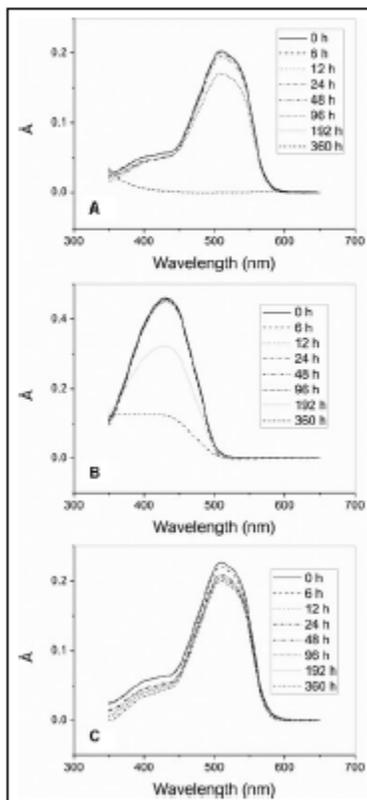


Figure 5—Absorption spectra, after different times of irradiation at 652 W/m², for the solution containing (A) Allura Red and fructose, (B) tartrazine and fructose, and (C) Allura Red and glucose.

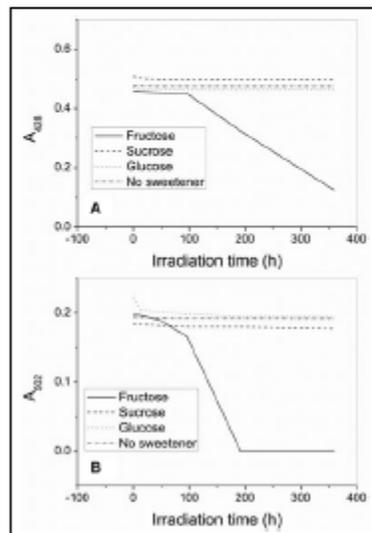


Figure 6—Time progression curves for irradiation, at 652 W/m², of the various solutions containing tartrazine (A, followed at 428 nm), or Allura Red (B, followed at 502 nm).

times, which is a logical result as fructose 42 is an approximately equimolar mixture of these 2 monosaccharides. The band eluting at 16.7 min may be related to the maltoextrin added in the manufacture of the liqueur. Figure 8A and B show the chromatographic traces for this amaretto at zero time and after 360 h of irradiation in a 1-cm cell at 652 W/m², indicating that there is essentially no change in the sugar composition during this irradiation. Similarly, the 360-h irradiation of the amaretto formulation prepared with sucrose showed main chromatographic bands at 10.2 min, identified as sucrose by this retention time, and at 16.7 min, unchanged from the trace obtained at zero time (data not shown).

HPLC analysis of the dyes in the commercial amaretto formulation, with absorbance monitoring at 428 nm and 502 nm, showed main bands (Figure 9 and 10, respectively) eluting at 3.9 min (registering mainly at 428 nm and to a lesser extent at 502 nm) and at 7.0 min (registering mainly at 502 nm and to a lesser extent at 428 nm), interpreted as tartrazine and Allura Red, respectively, on the basis of their elution times and of their absorbance spectra. Minor chromatographic bands, eluting at 5.5 min and 9.4 min, are also present in the amaretto sample (Figure 9 and 10), but were not seen in the dye standards (data not shown). During irradiation of the amaretto sample at 652 W/m² in a 1-cm cuvette, the content of tartrazine and of Allura Red was much reduced after 48 h,

and virtually eliminated after 96 h (Figure 9 and 10), indicating that the overall color reduction at 428 nm and at 502 nm seen in the absorption spectra of the irradiated amaretto formulation (Figure 2A) does indeed reflect the consumption of tartrazine and Allura Red.

Of special interest in the results here reported is the absolute light requirement for the degradation of the azo compounds by the monosaccharides that has been demonstrated. This might indicate that the dye molecules participate in the decoloration reaction only in their excited state. Another explanation would be based on a consideration of the *cis* and *trans* forms of the azo compounds. The decisive step in the decoloration of these azo dyes is likely a bimolecular redox reaction in which the reducing sugar is oxidized with concomitant reduction of the azo compound to the corresponding colorless *N,N'*-disubstituted hydrazine. The transition state in this concerted process can be written in the form of a cyclic intermediate, which is sterically more favorable in the case of the *cis* isomer of the azo compound, compared to the *trans* form. Generally, in arylazo compounds, the *trans* form is by far more highly represented, but there is a photoactivated interconversion between the 2 isomers (Brode and others 1952; Gabor and Bar-Elis 1968; Simonov and Lavrichov 1999), which would help to populate the less stable *cis* configuration, the

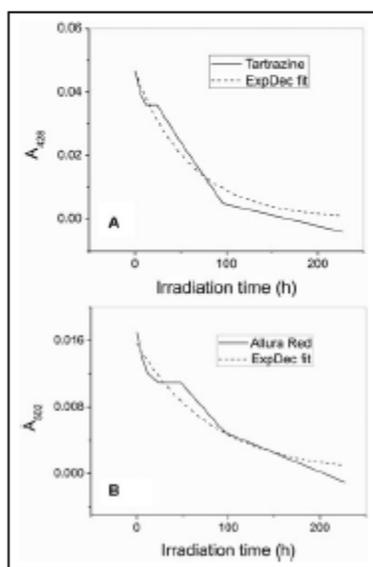


Figure 7—Time progression curves for the experiments conducted at 652 W/m² in 1-cm cells along with the corresponding 1st order decay fits. (A) Solution with tartrazine and fructose followed at 428 nm, (B) solution with Allura Red and fructose followed at 502 nm.

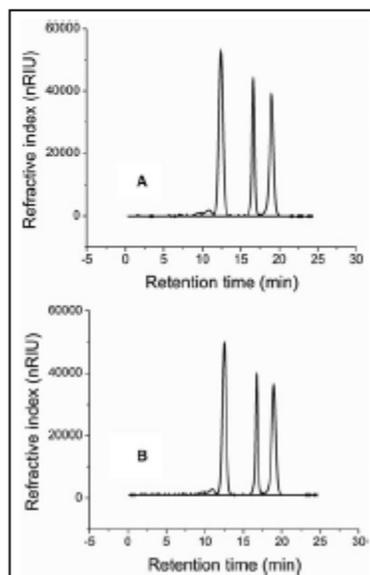


Figure 8—Chromatographic traces for the sugar analysis (using the Aminex HPLC 87P column) of the amaretto formulation with fructose 42 (A) at zero time, (B) after 360 h of irradiation at 652 W/m², in a 1-cm cuvette.

Decoloration of an amaretto liqueur ...

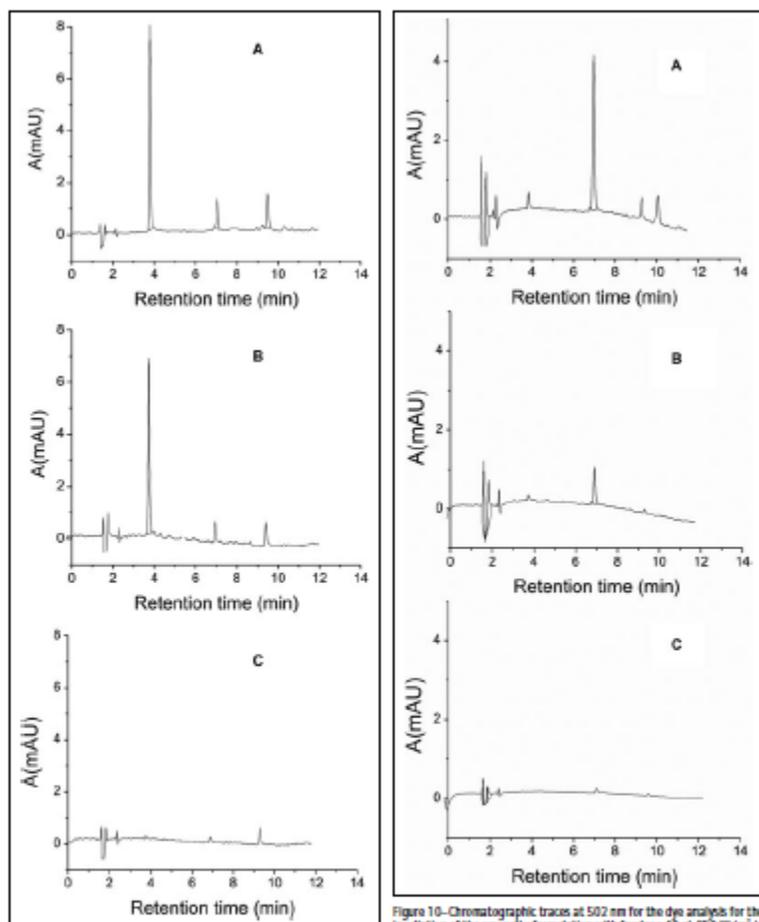


Figure 9—Chromatographic traces at 428 nm for the dye analysis (using the XDB-C18 column) for the irradiation of the amaretto formulation with fructose 42 at 652 W/m² in a 1-cm cuvette, for (A) zero time, (B) 48 h, and (C) 96 h.

Figure 10—Chromatographic traces at 502 nm for the dye analysis for the irradiation of the amaretto formulation with fructose 42 at 652 W/m² in a 1-cm cuvette, for (A) zero time, (B) 48 h, and (C) 96 h.

more reactive isomer for the redox mechanism outlined above. In this interpretation, the contribution of the light would be in the conversion of the highly preferred *trans* *axo* configuration to the *cis* configuration.

Conclusions

The kinetics of decoloration was examined for a Mexican product of the amaretto-type, leading to the following conclusions. For significant color loss to occur, light is an absolute requirement, with higher irradiance values leading to faster decoloration kinetics. In the comparison of the prepared amaretto samples, the formulation containing sucrose instead of the fructose 42 used in the commercial preparation showed greater color stability, while the formulation without added sweetener was even more stable. Thus, the results point out the need to protect this liqueur from light, and suggest the replacement of high-fructose syrup by sucrose as an improvement in the formulation of the commercial product. Obviously, compared to the rapid degradation observed in the present studies in 1-cm cuvettes, the liqueur will show greater color resistance to light in its usual presentation, the typical flattened amaretto bottle, which defines a layer thickness of several centimeters for the liquid content, even in conditions of strong sunlight (at, for instance, 500 W/m²).

Even clearer results were obtained with test solutions containing the pure *axo* dyes in alcohol-water solution, in the presence of the different saccharides, which were provided in pure form. Here, it was seen that the reducing monosaccharides were effective in the photoreaction of either dye, with D-fructose clearly stronger than D-glucose in this respect, while no reaction was seen with the nonreducing disaccharide, sucrose, or in the absence of any saccharide.

The results obtained in the present work are of interest from the chemical point of view, as photomodification of *axo* compounds with reducing sugars has heretofore not been reported. Beyond that, the results are of importance from an industrial aspect, as *axo* dyes, sugars, and light will often coincide in the manufacture or storage of foods and beverages, with the attendant possibility of decoloration as documented in the present work. The case here examined may serve as a reminder that replacement of established sweeteners, such as sucrose, by modern industrial sweeteners, such as high-fructose syrup, which are chemically different, requires careful case-by-case consideration.

Acknowledgments

This research was supported by the Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Inst. Politécnico

Nacional, Querétán, Mexico, and the Univ. Tecnológica de San Juan del Río, Querétán, Mexico. We are grateful to the staff of the Radiometry Dept. of the Mexican Centro Nacional de Metrología for the measurements with the pyroelectric radiometer. The HPLC instrument used in this work was purchased with funds from CONACYT (Basic Research Grant Nr 61322).

References

- Arnold SJ, David AW, Douglas BJ. 2000. Food additives. In: Kirk RF, Othman DE, editors. *Encyclopedia of chemical technology*. 5th ed. Vol. 12. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 26-72.
- Baek WS, Gould BJ, Wyatt DM. 1982. The relation between the absorption spectra and the chemical constitution of dyes. *J Am Chem Soc* 74:4641-4.
- Chang ET, Fok CE, Light M. 1978. Reduction of *axo* dyes by dissolved alcohols. *Appl Biochem* 20:599-62.
- Davis W, O'Neill C, Harker PR, Roberts HM. 1998. Kinetic assessment of insulin absorption in vivo. *J Pharm Technol* 17:323-35.
- Friedrich Schickel H. 2006. *Zusatzstoffe: Aromastoffe, Konservierungsstoffe, Farbstoffe, Süßungsmittel und Stabilisatoren (aroma-stoffe)*. Stuttgart: Neumann, Germany. <http://www.schickel.de>. <http://www.schickel.de/qualitaet/2006/46/06/06/Farbstoffe/Datensheet.pdf>. Accessed Oct 1, 2010.
- Galus C, Rao KS, Kati 1968. Conformational isomerism of 1,1'-dithiolated *axo* compounds. *J Phys Chem* 72:153-5.
- He YL. 2003. Kinetic of acetalization and stability of isomerism of acetaldehyde product from *axo* dyes by fructose. *Chem. Wiss. Sci Technol* 43:261-9.
- Lechner A, Malley TJ, Crane ML. 1987. Differentiation between glucose, maltose, dextrose, and galactose in plant physiology by high-performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr* 380:45-8.
- Li Y, Guo JY. 2010. Color removal from aqueous solutions of the reaction *axo* dye removal. *Block II safety the remediation cells (Shanghai South)* [B 143] *cellular gas membrane system*. *J Water Resour Prot* 2:77-84.
- Murphy A, Pegg S, Cooper J, Schmidt H, Jahn CH. 2010. Identification and isolation of an acetaldehyde from *axo* dyes. *J Pharm Sci* 124:45-8.
- Murphy G, Briggs C, Suter P, Pegg J, Forsyth A, Ferguson A. 2010. Ultrasonic reaction setup for the synthesis and isolation of *axo* dyes. *Proceedings of the 15th International Conf. on Ultrasonic Science and Technology*, East, Taiwan, September 2010. Chulalongkorn University.
- Rao KS, Corbridge CE. 1965. Reduction of *axo* dyes and chromogenic compounds by hydrogen sulphide from the formalin solution. *Ind Health Phys* 10:209-17.
- Rosillo I, Castellón San José ME. 2003. Addition of pyridinic nitrogen: an structural process which improves the chromogenic and stability of red dyes. *Int J Food Sci Technol* 38:28-36.
- Rosillo R. 2002. FD & C color. *Appl Food Sci Technol* Santa Clara, Calif: Applied Tech. Inc.
- Rosillo R, Suter P, Suter CA, Rosillo RJ. 1991. Chemical stability during storage of all *axo* dyes in aqueous solution. *J Food Sci* 56:475-9.
- Rosillo R. 2010. Reduction of *axo* dyes and chromogenic compounds with hydroxide hydride. *Monatsh Chem* 141:1-6.
- Rosillo R. 2004. *Problemas de color en vitro durante el proceso DME. Hipótesis y verificación*. La Serna: Vicens Vives, Spain.
- Rosillo R, Murillo-Rosillo E, Nicolás U, Vázquez E, Yagüe-Pedraza A. 2005. Reduction of a novel chromogenic dye from *axo* dyes by hydrogen sulphide from insulin. *Chem Eng* 111:63-70.
- Schickel H, Lersch H. 1995. Deposition of chromogenic product in liquid crystal polymer film containing *axo* compounds. *Chem Mater* 7:1444-6.
- Schickel H, Suter P, Suter CA, Corbridge CE. 2004. Reduction of *axo* compounds by *axo* and monosaccharide. *Synth Commun* 34:1441-6.
- Van Eke PJ, Schreiner JJ. 1998. *Chromatography*. In: *Reference*. CRC, editor. *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 703-11.