EL ACIDO ASCORBICO EN ENLATADÓS, CONSERVAS Y EN EL BOCADILLO DE GUAYABA

Resumen del Trabajo de Tesis presentado por Salomón Ferreira para optar al título de Químico Farmacéutico de la Universidad Nacional de Colombia.

Presidente de Tesis: Dr. EDUARDO CALDERÓN GÓMEZ.

INTRODUCCION

El presente trabajo tiene por objeto estudiar las modificaciones que se presentan en el contenido de ácido ascórbico en conservas alimenticias durante los procesos de preparación y almacenamiento.

Se expone, en primer término la importancia de la industria de conservas en Colombia, sus posibilidades de expansión y los elementos opuestos a su desarrollo. Se hace un resumen de los elementos que intervienen en la elaboración de un enlatado y en su calidad, los controles a que se somete la materia prima, así como el material en proceso y el producto terminado.

Se presentan aquí varios métodos de análisis, que siendo exactos y fáciles de revisar, brindan seguridad por su precisión y especificidad.

Dentro del gran número de métodos de análisis de ácido ascórbico se han tomado en consideración los clásicos como son los que utilizan el 26 Diclorofenolindofenol como substancia titulante. Se examinan también métodos modernos, prácticos y de gran especificidad como el de la 2,4 Dinitrofenilhidrazina y el del cloruro mercúrico.

No se consignan otros procedimientos por considerar que los estudiados son buenos representantes de la gran gama de métodos y técnicas empleadas en la valoración del ácido ascórbico y además porque los otros, aunque pudieran brindar más exactitud, resultan complicados y engorrosos, difíciles de llevar a la práctica y muy poco apropiados para

análisis de rutina. Todos los métodos han sido estudiados y evaluados con fines de aplicación en análisis de conservas y productos vegetales.

También se presentan aquí los resultados obtenidos en el estudio de la degradación del ácido ascórbico presente en enlatados, los factores que inciden en su estabilidad y los efectos resultantes de su degradación e inactivación.

Se examina además el papel que podría desempeñar como agente de preservación y al mismo tiempo su posible participación en el desarrollo de reacciones de oscurecimiento.

No es objeto de este trabajo profundizar en el estudio de las reacciones que se desarrollan en los fenómenos mencionados, lo cual sería objeto de un trabajo más especializado y extenso, sobre todo si se tiene en cuenta que las investigaciones más recientes no fijan un criterio suficientemente claro y definido a este respecto.

Además se consignan aquí los resultados obtenidos en el estudio de la degradación del ácido ascórbico a través del proceso de fabricación del bocadillo de guayaba.

Por último, puede decirse que toda investigación en este campo será de gran utilidad y permitirá asegurar la calidad del producto así como dar mayores garantías al productor y al consumidor, al utilizar como preservativos y anti-oxidantes substancias que como el ácido ascórbico, se encuentran en cantidades apreciables en la materia prima normalmente utilizada en la fabricación de conservas de productos vegetales.

LA INDUSTRIA DE LAS CONSERVAS EN COLOMBIA

Entre las industrias de alimentos, la de conservería es de las más recientes. Aparecieron primero la molinería de trigo, chocolate, pan, panela, azúcar y trilladoras de café; luego aparecieron molinería de arroz, galletas, pastas alimenticias y grasas vegetales. Posteriormente aparecieron la de leche pasteurizada y recientemente la de conservería y café soluble (1).

Sin contar más de 3.000 unidades artesanales o semifabriles muy pequeñas, hay unos 2.675 establecimientos que fabrican alimentos en forma industrializada. En general se trata de un conjunto de pequeñas industrias. Del número dado, más de 1.000 unidades son pequeños talleres de menos de 5 personas; solo hay 140 establecimientos con más de 50 personas ocupadas y entre ellas apenas 50 con más de 100 personas. Fábricas mayores, con más de 200 personas solo hay unas 20 y son casi todas ingenios, dulcerías, galleterías y chocolaterías.

La posición de la industria de conservas vegetales dentro de la industria de alimentos arroja un 3.3% de inversión fija con un 0.82% de producción bruta y un valor agregado de 1.93%.

La producción correspondiente a los años de 1956-57-58, expresada en toneladas y su valor correspondiente en millones de pesos colombianos puede apreciarse en el siguiente cuadro:

	1956 1		1 9	5 7	1 9	5 8
Grupos industriales y productos	Ton.	Mil\$.	Ton.	Mil\$.	Ton.	Mil\$.
Salsa de tomate en conserva.	259	0.6	792	4.0	1.309	3.8
Jaleas y mermeladas	1.246	1.9	638	2.5	846	3.1
Jugos de frutas	800	1.4	1.154	3.5	983	3.9
Bocadillos	2.313	3.2	2.853	6.2	2.407	5.4

El consumo per cápita/día en Gm. de algunos alimentos en 1961, en comparación con otros países puede apreciarse en el siguiente cuadro:

	U. S. A.	Colombia	Canadá
Frutas: enlatadas	29		63
Jugos	14		3
Congeladas	11		
Secas	4	-	
Total	58		66
Vegetales: Enlatados	56	0.3	21
Congelados	13		2
	69	0.3	23

Es decir, que en forma por demás aproximada el consumo per cápita de alimentos manufacturados envasados (excepto productos lácteos y cereales) en nuestro país es del orden de 1-2% del de países de gran desarrollo. Esto puede servir de indicador de las posibilidades de expansión de esta industria aunque hay que tener en cuenta las limitaciones de orden cultural, ambiental y económico que nos separan de esos países.

En el plan decenal (1962) se han propuesto las siguientes metas de desarrollo en cuanto a la industria de conservería se refiere:

ţ	1957-59	1964	1970
Industria de conservería Exportaciones de la industria de conservería en	44	100	236
millones de dólares		0.5	4.5

Para que la industria de conservería alcance estas metas, se requiere un crecimiento del 15% en términos relativos y en términos absolutos de 56 millones entre 1958 y 1964 y de 136 millones entre este año y 1970. Actualizando la cifra con los índices de precios que rigen hoy (1964) la producción debería aumentar a 438 millones en 1970.

ENVASES

En el mundo actual los envases metálicos juegan un papel muy importante al conservar por período más largo, muchos productos especialmente alimentos, los cuales están sujetos a un rápido deterioro.

La historia de esta industria comienza en el año de 1810 cuando un ciudadano inglés, Peter Durand, obtiene la primera patente para la construcción de un recipiente de estaño para preservar alimentos. A lo largo de muchos años se ha logrado una industria moderna equipada con líneas automáticas que varían según el tipo de envase, desde 1.000 envases por hora hasta 800 envases por minuto. Estos últimos envases cilíndricos con tapas y fondos metálicos, de los cuales un 90% es utilizado para la preservación de alimentos, se conocen con el nombre de "envases sanitarios". Desde tiempo atrás el material primordial para su fabricación ha sido la hojalata que hoy en día es un conjunto de materiales altamente especializados. Estos materiales deben manejarse con mucho cuidado para asegurar un resultado completamente satisfactorio y eficaz, capaz de preservar toda elase de alimentos.

La hojalata es una lámina de acero revestida con una capa de estaño, para obtener los resultados que se requieren al hacer los envases metálicos; estas láminas deben ser de máxima calidad en cuanto se refiere a formabilidad, buena apariencia, que permita buen laqueado y soldadura y resistencia a la corrosión.

Los enlatados y sus controles (2).

Debido al gran número de factores que inciden en la fabricación y conservación de un producto enlatado, es necesario que el productor haga controles de los principales elementos de calidad, con el fin de asegurarse del buen rendimiento, asegurar el prestigio de sus productos y en lo posible disminuír al mínimo los riesgos que el consumidor pueda correr por causa de un enlatado mal producido o mal conservado.

Cada producto o clase de productos necesita una serie de controles generales y algunos propios. Entre los principales pueden citarse:

- 1. Vacío.
- 2. Porcentaje de llenado.
- 3. Peso neto.
- 4. Peso escurrido.
- 5. Indice de refracción.
- 6. Densidad.
- 7. Humedad.
- 8. Color.
- 9. Viscosidad.
- 10. Cenizas.
- 11. Acidez-pH.
- 12. Vitaminas.
- 13. Análisis microbiológicos.
- 14. Residuos de insecticidas.
- 15. Análisis organoléptico.
- 16. Sólidos solubles.
- 17. Textura.
- 18. Cloruro de sodio.
- 19. Consistencia.
- 20. Sólidos totales

A continuación se presentan en un cuadro los análisis sugeridos para controlar algunos productos alimenticios.

I — ALIMENTOS PARA NIÑOS

Tipo	A base de:	Determinaciones durante el proceso	Determinaciones sobre el producto terminado
Compotas o purés.	Frutas.	_	Color. Consistencia. Sólidos solubles. Acidez. Sólidos solubles sobre acidez.
Jugos.	Frutas.	Tamaño de partículas en los sólidos.	Color. Sólidos solubles. Filamentos de hongos. Huevos y larvas. Fragmentos de insectos.

II — ALIMENTOS PARA ADULTOS

Clase	Determinaciones durante el proceso	Determinaciones sobre el producto terminado
Alverjas y otras hortalizas.	Sal (NaC1) en salmuera.	Textura.
		Peso drenado.
		Sal (NaC1).
Fríjoles en salsa de tomate.	En la salsa. Sólidos totales. Sal (NaC1). Acidez.	Sólidos totales. Acidez.
	Durante el llenado.	
	Peso del tocino.	
	Peso de los fríjoles.	
Fruta en almíbar.	En el almíbar.	En el almibar.
	Sólidos solubles.	Sólidos solubles (Brix. pH).
	Peso de la fruta.	Peso drenado. pH.
Jaleas de frutas.	En el jugo.	Color. Textura.
	Sólidos solubles. , pH.	Sólidos solubles. pH.

Clase	Determinaciones durante el proceso	Determinaciones sobre el producto terminado
Jugo de tomate.	Filamento de hongos.	Color.
		Sal (NaC1).
		Sólidos solubles.
		Filamentos de hongos.
		Fragmentos de insectos.
		Huevos y larvas.
Jugos de frutas.	Aceite de cáscara	Color.
· ·	en jugo de naranja.	Sólidos solubles.
	* 0	Filamentos de hongos.
		Fragmentos de insectos.
		Huevos y larvas.
Mermelada de frutas.	Sólidos totales de las	Color.
	frutas.	Textura.
	Acidez total.	Sólidos solubles.
	pH.	pH.
Salsa para condimen-		Acidez.
tos.	_	Sólidos totales.
Salsa de tomate.	Acidez.	Color.
	Filamentos de hongos.	Consistencia.
	3	Acidez.
		Filamentos de hongos.
		Fragmentos de insectos.
		Huevos y larvas.

LA EVALUACION ORGANOLEPTICA Y SUS APLICACIONES

Mientras los ensayos físicos, químicos y microbiológicos, son muy importantes para el control de calidad de productos alimenticios, la evaluación organoléptica es igualmente indispensable para la producción diaria, la aprobación del producto para el mercado, la determinación de la gravedad de las anomalías, el mejoramiento de productos establecidos, el desarrollo de nuevos productos y la evaluación de ciertas materias primas.

Reacciones de obscurecimiento (3).

Cuando las frutas y los tejidos vegetales presentan cualquier deterioro, o son cortados y pelados durante el proceso de transformación, se presenta un obscurecimiento de los tejidos denominado como "Reacción de obscurecimiento". Esta reacción ha sido extensamente estudiada en algunas frutas y vegetales pero para la mayoría de ellas ha merecido poca investigación. Algunas reacciones de obscurecimiento son enzimáticas y solamente ocurren en tejidos vivos, frescos o por lo menos en tejidos que aún contienen enzimas activas. Por eso cuando las enzimas son desnaturalizadas por color o con otro agente cualquiera, la reacción no ocurre más. Consecuentemente aunque un durazno fresco se irá obscureciendo después de descortezarlo, un durazno enlatado ya no se obscurecerá. Sin embargo, pueden presentarse obscurecimientos no enzimáticos. Por esto cuando el jugo de naranja se concentra, frecuentemente se obscurece con un efecto nocivo no solamente sobre la apariencia sino también sobre el sabor. Esta reacción de obscurecimiento no es de carácter enzimático, ocurre a temperaturas por encima de las cuales se desnaturaliza la mayoría de las enzimas.

Métodos de valoración de la Vitamina C.

Sherman, LaMer, y Campbell describieron en 1922 (4) un método biológico para valoración de la vitamina, razonablemente satisfactorio y basado en la determinación de la mínima cantidad de producto requerida para proteger los curíes del escorbuto. Desde entonces se han desarrollado numerosos métodos biológicos y químicos para determinar la actividad antiescorbútica o la cantidad de ácido ascórbico presente en un producto.

Las pruebas biológicas consumen mucho tiempo, son costosas y dejan mucho que desear en cuanto a precisión se refiere. Sin embargo, las pruebas biológicas tienen la ventaja de poder medir la sumación de los productos que poseen actividad antiescorbútica pero excluyen los materiales que impiden la actividad de la vitamina C.

De los varios métodos biológicos en uso, el basado en el estudio de los cambios histológicos producidos en la estructura de los dientes parece ser el que tiene mayor grado de especificidad.

Desde que se desarrollaron los métodos químicos para la determinación de ácido ascórbico, los ensayos biológicos han sido desplazados y hoy se utilizan especialmente en estudios comparativos para establecer la especificidad de los métodos químicos para determinar el ácido ascórbico en productos individuales. La actividad de vitamina C determinada por un método químico satisfactorio no debe diferir más de más o menos

20% del valor obtenido por método biológico. Esta variación se permite para compensar la falta de precisión del método biológico.

La oxidación del ácido ascórbico con 2,6 diclorofenolindofenol ha encontrado extenso uso como base de técnicas de determinación de ácido ascórbico.

Bessey y King (5) describieron adaptaciones de métodos de titulación visual con técnicas relativamente simples que requieren el uso de una cantidad mínima de aparatos y reactivos químicos. Tales métodos, sin embargo, no son aplicables al estudio de productos que contienen pigmentos solubles en agua o en ácidos, o agentes reductores distintos del ácido ascórbico y que reaccionen con el 2,6 diclorofenolindofenol a una velocidad lo suficientemente grande como para influenciar el punto final de la titulación.

Los métodos fotométricos (6, 7 y 8) basados en la reacción con el 2,6 diclorofenolindofenol eliminan algunas de las limitaciones presentes en el método de titulación visual. Las dificultades encontradas en la determinación del punto final en titulación de productos moderadamente turbios o de extractos ácidos pigmentados son parcialmente superadas por instrumentación. Con el método fotométrico también es posible determinar la extensión a la cual la reacción de óxido-reducción ha progresado en determinado intervalo de tiempo. Limitando el tiempo de la reacción y corrigiendo la influencia de los agentes reductores no específicos durante un tiempo definido, es posible impedir, dentro de ciertos límites, el efecto de ciertos agentes reductores distintos del ácido ascórbico.

En el caso de extractos altamente pigmentados o de extractos ácidos, turbios, los métodos fotométricos no son enteramente satisfactorios para medir el grado de reducción del 2,6 diclorofenolindofenol. El hecho de que éste sea fácilmente soluble en xileno hace posible el uso de la técnica de extracción con xileno para eliminar la interferencia de los pigmentos solubles en la solución ácida y de soluciones turbias. Sin embargo, se ha reportado que la betaxina presente en la remolacha reacciona con el indofenol en el método del xileno modificado, dando resultados erróneos.

El valor del 2,6 diclorofenolindofenol está limitado por la presencia de agentes reductores como sales ferrosas, sulfitos, compuestos de sulfhidrilo, compuestos tipo glucosamina, ácidos reductores y reductonas. Algunos productos, especialmente aquellos que son sometidos a tratamientos prolongados con calor, o a un almacenamiento prolongado, contienen substancias llamadas colectivamente "reductonas". Aunque esas sustancias no han sido identificadas químicamente, parece probable que se parezcan más a compuestos tipo glucosamina que a reductonas pro-

ducidas por acción de álcalis sobre el azúcar o ácidos reductores formados por acción de ácidos sobre pentosas.

Se han ideado algunos procedimientos para disminuír al mínimo estas interferencias (9, 10 y 11). El tratamiento del extracto con peróxido de hidrógeno elimina la interferencia de los sulfatos, hierro reducido y zinc, y por adición de formaldehído al extracto puede lograrse una corrección de la interferencia debida a las reductonas y compuestos relacionados.

Sin embargo, mientras no se conozca la naturaleza de los agentes reductores distintos del ácido ascórbico, no puede decirse que la modificación del formaldehído ofrece una discriminación analítica exacta entre esos materiales y el ácido ascórbico. Se ha propuesto el uso de la ácido ascórbico-oxidasa para efectuar una oxidación selectiva de la vitamina C. La habilidad de la enzima para efectuar una oxidación selectiva de la vitamina en presencia de otros materiales reductores ha sido puesta en duda. Recientemente el uso de la oxidación enzimática del ácido ascórbico a dehidroascórbico se ha sugerido como base para la determinación de la vitamina C.

La reacción de los derivados del ácido ascórbico con 2,6 diclorofenolindofenol permite la determinación del ácido ascórbico por métodos que no están basados en las propiedades de óxido-reducción. Una técnica descrita por Roe y colaboradores para la determinación de ácido ascórbico reducido, dehidroascórbico y dicetogulónico, parece corregir para cierto tipo de agentes reductores incluyéndose ellos en la fracción dicetogulónica. Los azúcares, reductonas y ácidos reductores también forman osazonas con el ácido dicetogulónico, pero sus propiedades y velocidades de formación son diferentes. Se ha desarrollado un método para corregir la interferencia de las sustancias basado en la velocidad de formación de la osazona (12).

TOMA DE LA MUESTRA.

La importancia de una manipulación apropiada de las muestras nunca será bien recalcada. La muestra y la extracción de los materiales que van a ser examinados debe hacerse de tal manera que se disminuya al mínimo la posibilidad de que ocurran cambios significativos en el ácido ascórbico antes del análisis.

Después de que los materiales son cortados, machacados, pulverizados o picados, deben manipularse muy rápidamente y mezclarse con ácidos estabilizantes tan rápidamente como sea posible para prevenir una oxidación indebida del ácido ascórbico. Esto es particularmente cierto en productos crudos con alto contenido de ácido ascórbico-oxidasa.

En cuanto sea posible la titulación debe hacerse en presencia de un ácido estabilizador tal como metafosfórico al 6% en agua, el cual retarda la oxidación del ácido ascórbico por inactivación del efecto catalítico de la ácido ascórbico-oxidasa y del cobre. El ácido metafosfórico, también precipita las substancias que interfieren tales como las proteínas y por lo tanto facilita la subsecuente clarificación del extracto. Para la mayoría de los productos se usa el ácido metafosfórico para la extracción. Sin embargo, si hay hierro presente, como puede suceder en enlatados que han sido almacenados por largos períodos de tiempo o en ciertos productos farmacéuticos, entonces puede usarse ácido acético al 8%. Este medio de extracción tiene la ventaja particular de disminuír al mínimo la intervención del hierro.

Los alimentos deshidratados requieren una ligera variación en cuanto a la toma de la muestra. El peso definitivo de la muestra es hidratado con 100 c. c. de solución de metafosfórico al 3% en agua, por 15 minutos aproximadamente, después se mezcla y se sigue el procedimiento general de análisis. Los alimentos que fueron tratados con compuestos de azufre como el H₂S o SO₂ durante la deshidratación, deben ser tratados con reactivos adecuados tales como acetona para remover el SO₂ antes de la medida del ácido ascórbico (13).

METODO DE TITULACION VISUAL CON 2,6 DICLOROFENOLINDOFENOL Principio.

Este método se basa en la reducción del 2,6 diclorofenolindofenol por una solución ácida del ácido ascórbico. En ausencia de sustancias que interfieran, la capacidad del extracto de la muestra de reducir la solución reactivo, como se determina por titulación, es directamente proporeional al contenido de ácido ascórbico.

PROCEDIMIENTO

I — Extracción.

- A) Mezclar cantidades iguales (200-300 Gm.) de la muestra y de una solución de ácido metafosfórico al 3% hasta obtener una masa transparente.
- 1. El procedimiento descrito es aplicable a productos alimenticios, pero puede ser modificado para el uso en análisis de sangre, etc.
- 2. Se requiere una muestra grande para obtener una muestra representativa de masa homogénea del material a analizar. Para el análisis de productos enlatados de contenido neto comprendido entre 150-180 Gm. basta tomar 100 Gm. de muestra.

- 3. La solución de ácido metafosfórico al 3% no es adecuada para inactivar las enzimas presentes en ciertos vegetales frescos. Se prefiere por esto la solución al 6% (14).
- 4. Se ha recomendado el uso del ácido acético al 8% como solución extractora para análisis de materiales que pueden contener grandes cantidades de hierro en forma ferrosa. Esta condición puede ocurrir cuando los alimentos enlatados han sido almacenados por largos períodos de tiempo antes de abrirse.

Cuando se usa ácido metafosfórico o ácido oxálico como medios de extracción el hierro ferroso reducirá al 2,6 diclorofenolindofenol dando resultados erróneamente altos de contenido de vitamina C. Si se usa el ácido acético, el hierro ferroso no reacciona con el titulante a una velocidad lo suficientemente grande como para afectar la titulación. La explicación teórica dada a este fenómeno es que el ácido metafosfórico y el ácido oxálico reaccionan con el hierro ferroso y alteran el equilibrio ferroso-férrico. Esto permite que el hierro ferroso reduzca al titulante. Cuando se usa acético como medio de extracción, el hierro ferroso no es removido de su condición de equilibrio y la reducción del titulante en estas condiciones no tiene lugar. (15, 16). Debe enfatizarse, sin embargo, que cuando las enzimas oxidativas o los catalizadores tales como los iones Cu++ están presentes, el ácido acético no estabiliza el medio. Por eso el uso del ácido acético como medio de extracción debe limitarse a aquellos productos que han sido procesados y se sospecha que estén contaminados con cantidades apreciables de iones ferrosos.

- 5. Si el material es un líquido con un bajo contenido en sólidos no es necesario realizar este paso. Puede procederse inmediatamente con el paso I-B.
- 6. Cuando por razones económicas o por la dificultad de conseguir el reactivo se rechaza el ácido metafosfórico como medio de extracción, puede emplearse una solución de ácido oxálico al 1%. (17). En este caso debe usarse una solución de ácido oxálico al 2% para hacer la extracción inicial, lo que conduce a una concentración de 1% de ácido oxálico debido a que se toman cantidades iguales de muestra y de solución extractora.

Si hay presentes grandes cantidades de vitaminas puede resultar un extracto turbio, indeseable, porque este ácido no resulta tan efectivo como el ácido metafosfórico para precipitar las proteínas.

7. Se ha sugerido el uso de atmósfera inerte durante la mezcla de materiales biológicos que contienen grandes cantidades de catalizadores oxidantes. Esta operación tiende a disminuír al mínimo el contacto con el oxígeno del aire.

La manera más simple es introducir nitrógeno con ayuda de un tubo de vidrio en el recipiente donde se efectúa la mezcla y por debajo de la superficie del líquido extractor. Si el nitrógeno se hace burbujear en el líquido por 15-30 sgs. antes de empezar la mezcla, la posibilidad de oxidación por catalizadores o por enzimas que se liberan en el rompimiento de las células de los tejidos es algo menor. Esto es particularmente cierto si el medio extractor no inactiva completamente estos catalizadores.

- B) Pesar de 10-30 Gm. de esta masa (suficiente para que contenga 1-5 mg. de ácido ascórbico), en un vaso de precipitados de 100 c. c. y pasarlos completamente a un matraz aforado de 100 c. c. Completar a volumen con solución de ácido metafosfórico al 3%.
- 1. En este momento es aconsejable hacer la pesada y la dilución tan rápidamente como sea posible para disminuír al mínimo la oxidación debida a falta de medio estabilizante que inactive completamente los catalizadores presentes.
- 2. En la dilución de mezcla, la presencia de espuma puede dificultar la aforada al volumen correspondiente. Se han obtenido buenos resultados agregando una gota de alcohol caprílico para romper esa espuma. Este reactivo parece no tener influencia sobre los pasos subsiguientes del procedimiento.
- 3. En el traspaso de la masa ya pesada al matraz donde se ha de completar a volumen puede resultar ventajoso para disminuír las pérdidas al mínimo, el uso de un embudo de cuello corto.
- 4. En el caso de productos que fueron tratados con anhídrido sulfuroso durante la deshidratación, el efecto de éste puede eliminarse rápidamente por adición de 20 c. c. de acetona antes de completar a volumen.
- ${\bf C})$ Filtrar la muestra diluída desechando los primeros ${\bf 5}$ c. c. de filtrado.
- 1. Esta eliminación se hace debido a que en el primer volumen de líquido que pase puede presentarse una pequeña absorción del material por parte del papel de filtro.
- 2. La muestra puede ser centrifugada en lugar de filtrada a juicio del operador. Para muestras que no fluyen libremente es preferible la centrifugación.
- 3. Los análisis hechos con jugo de piña y néctar de guayaba mostraron buenos resultados cuando se empleó la filtración para clarificar el líquido. Cuando se analizó pasta de tomate resultó más apropiado usar la centrifugación en una centrifuga Cenco 1 1.700 RPM por 15 minutos, empleando tubos de 15 c. c.

II — Titulación del ácido ascórbico reducido.

- a) Medir con una pipeta 10 c. c. del filtrado en un Erlenmeyer pequeño (50 c. c.).
- 1. En el caso de productos de bajo contenido de ácido ascórbico (5 mg% o menos) es conveniente tomar una alícuota de 25 cc. Si se desea tomar 10 cc., usar una solución de 2,6 diclorofenolindofenol al 0,01 por ciento para facilitar la detección del punto final.
- b) Titular inmediatamente con la solución de 2,6 diclorofenolindofenol hasta color rosado débil persistente por 15 segundos.

El titulante en solución diluída de bicarbonato de sodio es de color azul pero en medio ácido como el proporcionado por la solución extractora es rosado. Por eso el cambio de color que tiene lugar durante la titulación es el siguiente: al agregar el colorante se forma un color rosado en la zona de contacto, este color desaparece por agitación. Cuando el punto final está próximo, la desaparición del color rosado es más lenta. El punto final se toma cuando el color rosado débil persista por 15 segundos. Es aconsejable hacer primero una titulación de tanteo y luego hacer otra agregando el colorante rápidamente hasta cerca del punto final. Entonces agregar, tan rápidamente como sea posible, gota a gota y con agitación, la solución titulante hasta obtener el color rosado persistente por 15 segundos.

Es aconsejable hacer una titulación rápida porque es posible que se presente interferencia de los otros constituyentes de la solución. En general tales materiales reaccionan más lentamente con el titulante que el ácido ascórbico, por lo tanto su efecto puede ser mantenido a un nivel mínimo por titulación rápida.

III — Cálculos.

a) Calcular el contenido de ácido ascórbico de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{\mathrm{V} \times \mathrm{T}}{\mathrm{W}} \times 100 = \mathrm{mgr.}$$
 de ácido ascórbico $\times 100$ Gm. de muestra, en donde: $\mathrm{V} = \mathrm{c.\,c.}$ de titulante usados para la titulación.

T= equivalente de ácido ascórbico expresado como mg. de ácido ascórbico \times c. c. de titulante.

W = Gm. de muestra en la alícuota titulada.

El método de titulación visual como se describe mide el ácido ascórbico reducido, no el total (reducido más dehidroascórbico). La reducción

con ácido sulfhídrico se ha descrito como satisfactoria para transformar el ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico (18).

Si un extracto ácido de la mezcla es tratado con H_2S seguido por la remoción del ácido sulfhídrico por burbujeo de nitrógeno a través de la solución la titulación con la solución de 2,6 dielorofenolindofenol puede dar una medida del ácido ascórbico más el ácido dehidroascórbico. El valor de este procedimiento es muy discutible (19).

Produce mejores resultados para la valoración del ácido dehidroascórbico el método de la 2,4 dinitrofenilhidrazina de Roe y Oesterling. También puede emplearse el método fotométrico utilizando el 2,6 diclorofenolindofenol, en la determinación de ácido ascórbico total (20).

Las determinaciones por duplicado y sobre una sola muestra deben conducir a valores que no difieran más del 5%. En muchos casos, especialmente en productos de alto contenido de ácido ascórbico, pueden esperarse mejores resultados.

CONSIDERACIONES AL METODO

Los análisis de jugos, pastas, néctares, frutas en su jugo, etc. se hicieron sobre enlatados cuyo contenido neto oscila entre 175-185 Gm. La muestra tomada, 100 Gm., resultó ser satisfactoria. Los análisis efectuados con cantidades mayores de muestra arrojaron los mismos resultados.

Para la segunda dilución se tomaron en su mayoría muestras de 10 Gm. de mezcla. En los análisis efectuados con jugos de piña y guayaba no se presentaron problemas con los sólidos y partículas en suspensión. En ambos productos los sólidos pueden ser fácilmente removidos por filtración y si se desea, centrifugación, aunque se consiguen buenos resultados con la filtración usando papel de filtro cualitativo. En los análisis de jugo de piña se presentó abundante precipitación de proteínas al tratar la muestra con la solución de ácido metafosfórico al 6%. Es necesario eliminar estas proteínas porque pueden dificultar la apreciación del punto final. Se consigue fácilmente por filtración por papel de filtro cualitativo. En los análisis de jugos y néctares de guayaba las proteínas precipitadas fueron menos abundantes y aparecen después de cierto tiempo. Al efectuar la segunda dilución para llevar a 100 c. c. la cantidad de espuma presente fue despreciable, no impidiendo la aforada a volumen.

Los jugos y néctares de guayaba y piña, respectivamente, no presentaron dificultades respecto de la coloración de las soluciones. El jugo de piña comunica a la solución una coloración amarilla débil que luego se vuelve casi blanca al efectuar la segunda dilución. El néctar de guayaba comunica un color rosado débil que luego desaparece casi por completo al efectuar la última dilución.

Los análisis efectuados con pasta de tomate, jugo de tomate y salsa de tomate presentaron dificultades por la coloración de la solución debido a la presencia de gran cantidad de pigmentos solubles en la solución extractora ácida.

Fue necesario hacer posteriores diluciones con la segunda dilución proveniente de una muestra de pasta de tomate así: 100 Gm. de pasta de tomate y 100 Gm. de solución de ácido metafosfórico al 6%. De esta pasta se tomaron 10 Gm. y se diluyeron hasta 100 c. c., con solución de ácido metafosfórico al 3%. De esta solución se tomaron 5 c. c. y se diluyeron hasta 50 c. c. Se tomaron 10 c. c. y se gastaron para titularlos 0,2 c. c. de la solución de 2,6 diclorofenolindofenol.

Como puede deducirse de lo anterior, el método no resulta aconsejable para análisis de ácido ascórbico en enlatados de productos altamente coloreados y que tengan gran cantidad de pigmentos solubles en soluciones acuosas ácidas, como sucede con la pasta de tomate y los productos de éste en general.

El empleo de la técnica que aconseja el burbujeo de H₂S a través de la solución ácida del producto, con el fin de reducir el ácido dehidro-ascórbico presente a ácido ascórbico para titular ácido ascórbico total no dio resultados satisfactorios. Se hizo burbujeo de H₂S a través de la solución durante 15 minutos y luego eliminación de éste por burbujeo de nitrógeno hasta que el nitrógeno desprendido no produjo ennegrecimiento de una tira de papel de filtro impregnada con solución de acetato de plomo. Los análisis efectuados sobre la solución tratada con H₂S y sobre la solución sin someter a este tratamiento dieron los mismos resultados.

DETERMINACION POR COLORIMETRIA CINETICA (20)

Principio.

El método de Meunier se basa en la reacción de Tillmans: reducción del 2,6 diclorofenolin dofenol por el ácido ascórbico a pH 4.0. El efecto de otros reductores presentes en los tejidos es muy reducido.

La primera lectura colorimétrica se hace después de 15 segundos contados a partir del momento de la adición de la solución de ácido ascórbico y se continúa haciendo lecturas a los 30, 45, 60 y 90 segundos. Se construye así la curva de decoloración cinética del 2,6 diclorofenolindofenol por el ácido ascórbico. La cantidad de ácido ascórbico se de-

termina por la decoloración producida en el instante cero de la curva, que se calcula por extrapolación.

METODO DE LA 2,4 DINITROFENILHIDRAZINA

A) Principio.

Este procedimiento es una adaptación (21) del método descrito por Roe y colaboradores (22, 23), está basado en la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico y subsecuente conversión de este ácido en ácido dicetogulónico, seguido por copulación con 2,4 dinitrofenilhidrazina bajo condiciones cuidadosamente controladas para dar osazonas de color rojo. La comparación del color producido por la sustancia problema, con la producida por soluciones tipo de ácido ascórbico, se utiliza para determinar el contenido de ácido ascórbico.

B) Procedimiento.

Este procedimiento describe la determinación de ácido ascórbico total, representado por ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y ácido dicetogulónico si están presentes.

Este método es aproximado como prueba antiescorbútica de muchos alimentos frescos cuando los ácidos ascórbico y dehidroascórbico están presentes y el ácido dicetogulónico no se ha formado en cantidades apreciables. Muchos alimentos frescos contienen menos del 5% de ácido dicetogulónico (24).

Por esto este método es valioso en la determinación del ácido ascórbico original contenido en los alimentos al tiempo de la recolección. Si hay duda acerca de la frescura del producto o si se desea un alto grado de especificidad, pueden diferenciarse los 3 compuestos tal como se describe.

Este último procedimiento sin embargo tiene aplicaciones limitadas, puesto que se usa más eficientemente con muestras pequeñas.

1. Extracción.

a) Mezclar 200 Gm. de la muestra y 200 Gm. de la solución de ácido metafosfórico al 10% por 2-5 minutos hasta obtener una masa homogénea. Para análisis de enlatados de contenido neto entre 175-185 Gm. es suficiente tomar 100 Gm. del producto si se trata de material con pocos sólidos en suspensión como en el caso de jugo de piña y de guayaba. Para productos que tengan consistencia de pasta es aconsejable tomar el contenido total.

b) Pesar de 10-40 Gm. de esta masa que se calcula contenga 1-2 mg. de ácido ascórbico, en un vaso de precipitados de 50 c. c. y pasarlo cuantitativamente a un matraz aforado de 100 c. c., de tapa esmerilada, con ayuda de la solución de metafosfórico al 5%, completar a volumen con la misma solución, y mezclar completamente.

Para el análisis de jugo de guayaba se obtuvieron resultados satisfactorios tomando 20 Gm. de la primera dilución que contiene 10 Gm. de muestra.

c) Remover los sólidos en suspensión por centrifugación y decantación del líquido sobrenadante o por filtración por papel Whatman Nº 12, plegado (o equivalente). La escogencia entre filtración y centrifugación está influenciada por el tipo de producto que se analiza.

Para análisis de jugo de guayaba y néctar de guayaba puede emplearse con buenos resultados la centrifugación, usando para este fin una centrífuga Cenco que da 1.700 RPM, con tubos de 15 c. c. Para centrifugar 100 c. c. de líquido basta con centrifugar en 2 etapas, cada vez durante 10 minutos.

Los tubos de la centrífuga deben estar perfectamente limpios, lavados con agua destilada libre de cobre, y secos para evitar diluciones del líquido que darían resultados bajos del contenido de ácido ascórbico.

En el caso de que no se disponga de centrífuga, para productos con pocos sólidos en suspensión y que fluyen libremente puede emplearse con buenos resultados la filtración de papel cualitativo desechando los primeros 5 c. c., debido a que puede presentarse una ligera absorción del producto por parte del papel de filtro.

En el caso del análisis de pasta de tomate y de productos similares la filtración no es aconsejable por ser muy lenta y la clarificación del líquido es defectuosa.

En el análisis de jugo de piña se presenta una precipitación indeseable de proteínas. Es necesario dejar la solución hasta que precipite la mayoría de ellas y luego separarlas por filtración del líquido sobrenadante, o por centrifugación. Si las proteínas precipitadas no se separan bien, pueden influír notablemente en la determinación, pueden dar resultados erróneos hasta en un 5%.

La precipitación de proteínas en el análisis de jugo de guayaba es menos notoria y se separan bien por centrifugación o filtración.

2. Oxidación a ácido dehidroascórbico.

a) A la solución de D-1-(c) agregar 2-3 gotas de bromo con un gotero medicinal o una pipeta que permita medirlo sin peligro para el operador. No debe agregarse un exceso de bromo porque se gasta dema-

siado tiempo para eliminarlo. Agitar débilmente hasta que la solución esté ligeramente amarilla, desalojar el exceso de bromo por burbujeo de aire o nitrógeno a través de la solución.

1. Con excepción de algunas muestras pigmentadas, la solución se vuelve incolora al eliminar el bromo. En algunos productos como el jugo de piña la eliminación del bromo es rápida y la solución resultante clara. En otros productos como en el néctar y jugo de guayaba la inación del bromo es una operación tediosa y lenta, con formación abundante espuma debida probablemente a un alto contenido de saposes. Esto hace que en ocasiones sea necesario filtrar, después del bujeo de aire para eliminar el bromo, con el fin de clarificar la lación.

Una traza de bromo residual puede molestar al agregar la tiourea pasos posteriores.

2. El análisis de productos altamente coloreados y que contienen cantidad de pigmentos solubles en la solución ácida extractora, como es el caso de tunas (Opuntia ospinae) de color morado pronunciado que se lo comunica a la solución, ésta se torna incolora al agregar el bromo y adquiere un tono violado débil que no tiene mayor influencia en la valoración. La explicación dada a este fenómeno es la existencia de un pigmento que origina junto con el bromo una reacción de óxidoreducción con aparición del leucoderivado que luego, al desaparecer el agente oxidante, tiende a tomar el color original. La ocurrencia de este fenómeno hace que desaparezca el impedimento debido a la coloración pronunciada.

Se comparó el resultado obtenido por este método con el obtenido **por a**nálisis yodométrico y la diferencia fue de 0.5%.

- 3. Bolin y Bood (3) recomiendan el uso del 2,6 diclorofenolindofenol para oxidar el ácido ascórbico.
- b) A una alícuota de 10 cc. del extracto oxidado de D-2 (a) agregar 10 cc. de la solución de tiourea al 2% en ácido metafosfórico al 5% y mezclar completamente para obtener una muestra diluída de 20 c. c. que contienen aproximadamente 10 megr. de ácido ascórbico por c. c.
- c) A 5 c. c. del extracto oxidado de D-2 (a) agregar 10 c. c. de la solución de tiourea al 2% en ácido metafosfórico al 5% y 5 c. c. de ácido metafosfórico al 5% y mezclar completamente. Así se obtiene una solución diluída que contiene aproximadamente 5 mcgr. de ácido ascórbico por c. c.
- 1. De cada problema se hacen estas dos diluciones para eliminar posibles interferencias debidas a materiales distintos del ácido ascórbico. Si no hay presentes pigmentos rojos, es suficiente una dilución.

2. Es importante que la concentración final de tiourea en las soluciones sea la misma, puesto que la coloración desarrollada está influenciada por la concentración de tiourea.

3. Formación de la osazona.

- a) Medir 4 cc. de cada una de las diluciones de la muestra de D-2 (b), (c) en cada uno de los 4 tubos de ensayo.
 - b) Dejar un tubo de cada dilución para que sirva de blanco.
- c) A cada uno de los tubos restantes, agregar 1 c. c. de la solución de 2,4 dinitrofenilhidrazina al 2% en ácido sulfúrico 9N.
- d) Colocar todos los tubos en baño de agua a 37° + 0,5°C por 3 horas exactas. Puede emplearse para este fin, un baño que tiene graduaciones a 37°C y a 55°C y a distintas temperaturas. Este baño mantiene la temperatura dentro de los límites requeridos. Utilizando 12 tubos de ensayo del tamaño corriente y un vaso de precipitados de 800 c. c., la diferencia de temperatura del baño exterior y el agua del vaso es de 1°C (de 38° a 37°C). Al colocar el vaso de precipitados que contendrá los tubos de ensayo en el baño, la temperatura desciende. El tiempo debe contarse a partir del momento en que la temperatura se estabilice dentro de los límites requeridos.
- e) Después de 3 horas exactas, remover los tubos del baño de agua y colocarlos en baño de hielo. El hielo debe triturarse antes de finalizar el tiempo previsto y colocarse en un vaso de precipitados de 800 c. c. disponiendo una capa de hielo sobre el fondo del vaso. Colocar los tubos de tal manera que reciban una refrigeración completa.
- 1. Los extractos en los cuales van a determinarse separadamente los ácidos ascórbico, dehidroascórbico y dicetogulónico deben dejarse en el baño de agua por 6 horas. Con el fin de determinar las cantidades individuales de estos ácidos presentes en una muestra la copulación debe ir, prácticamente, hasta el final, por lo tanto se necesita un período largo de incubación.

El ácido dicetogulónico produce en un tiempo dado más osazona que el ácido dehidroascórbico porque este último debe transformarse primerc a ácido dicetogulónico. Se ha encontrado que en un período de incubación de 6 horas, el ácido dehidroascórbico presenta el 95% de la copulación del ácido dicetogulónico.

Para la determinación de ácido ascórbico total, se recomienda un período de incubación de 3 horas porque después de la oxidación con bromo, la mayoría de la vitamina está presente como ácido dehidroascórbico en la muestra y en la solución patrón. Sin embargo, las muestras que

contienen, raramente, grandes cantidades de ácido dicetogulónico pueden dar valores ligeramente altos cuando la lectura obtenida se compara con la obtenida después de un período de incubación de 6 horas, debido a la mayor velocidad de reacción del ácido dicetogulónico con la 2,4 dinitrofenilhidrazina.

4. Tratamiento con ácido sulfúrico al 85%.

(Formación del pigmento soluble).

a) Mientras los tubos están en el baño de hielo, agregar a cada uno y lentamente, 5 c. c. de ácido sulfúrico al 85%.

La adición debe hacerse en un tiempo mínimo de un minuto. La adición del ácido puede causar un obscurecimiento de las soluciones que contienen azúcares si el ácido se agrega muy rápidamente o si se permite elevar la temperatura.

Se aconseja agregar el ácido primero al tubo que sirve de blanco, porque a este hay que agregarle además 1 c. c. de la solución de 2,4 dinitrofenilhidrazina. Si se hace al contrario la diferencia de los tiempos de lectura puede originar errores de lectura debido a que cuando sea la hora de leer la coloración de la solución problema, la coloración en el tubo que sirve de blanco ha disminuído notablemente.

- b) Con los tubos aún en el baño de hielo, agregar 1 c. c. a los tubos que sirven de blanco de la solución de 2,4 dinitrofenilhidrazina al 2% en ácido sulfúrico 9N, previamente filtrada. Sin remover del baño de hielo, agitar con ayuda de una varilla de vidrio hasta homogenización completa. Empezar a contar el tiempo desde este momento.
- c) Remover los tubos del baño de hielo y dejarlos 30 minutos a la temperatura ambiente.

La intensidad del color continúa en desarrollo por algunos minutos y empieza a disminuír por reposo prolongado. Debe seguirse un horario para la adición del ácido sulfúrico, la solución de 2,4 dinitrofenil-hidrazina y hacer las lecturas.

5. Medida del color.

a) Seleccionar una longitud de onda comprendida entre 510-540 milimicras por medio de filtros o por medio de una escala móvil graduable por medio de un botón macrómetro y de otro micrómetro, como en el caso del fotocolorímetro Coleman modelo 6C. Asegurarse de que el cero del aparato está graduado; en caso negativo, graduarlo por medio del dispositivo destinado para tal fin.

- 1. Es posible con ciertos aparatos, como el fotocolorímetro de Eveyr e el fotocolorímetro Coleman modelo 6C, seleccionar tubos uniformes que permiten medir la transmitancia, en el mismo tubo en que se formá la osazona y se desarrolló el color con ácido sulfúrico al 85%, evitando así el traspaso de la solución corrosiva.
- 2. La absorción de la luz por el pigmento formado por reacción de la 2,4 dinitrofenilhidrazina y el ácido dicetogulónico presenta un máximo a 520 milimicras, para eliminar así la interferencia causada por las osazonas formadas a partir de los azúcares de la muestra.
- 3. Los alimentos enlatados que se han mantenido en una despensa o expuestos a temperaturas elevadas por largo tiempo pueden contener reductonas.

Su presencia puede ser detectada haciendo lectura de transmitancia a 450-490 milimicras después de copulación con 2,4 dinitrofenilhidrazina a 37°C por 3 horas.

La absorción por las reductonas es más intensa que por el ácido dehidroascórbico y produce una curva típica. Si esas substancias están presentes, las leturas que se obtienen a 540 milimicras, son más aproximadas que las obtenidas a 510-520 milimicras.

Si las reductonas están presentes en grandes cantidades es preferible el método del 2,6 diclorofenolindofenol acompañado de la modificación con formaldehído.

- b) Con el blanco en el aparato, ajustar el 100% de transmitancia. Esto permite corregir el error debido a coloraciones diferentes a la osazona formada durante la copulación con 2,4 dinitrofenilhidrazina.
- c) Con el instrumento calibrado en la forma descrita, colocar el tubo del colorímetro que contiene la solución problema y leer el % de transmitancia (G).

6. Curva de calibración.

Hacer una curva de calibración en papel semilogarítmico dibujando la transmitancia (G) sobre el eje de ordenadas y la concentración de ácido ascórbico expresada en megr. \times c. c. en el eje de las abcisas.

7. Cálculos.

a) Calcular el contenido total de ácido ascórbico de cada alícuota de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{R \times 100}{M} = M = M$$
 de ácido ascórbico total.

donde:

R = mcgr. de ácido ascórbico total por c. c. de solución diluída, obtenidos leyendo en la curva de calibración frente al valor correspondiente de % de transmitancia (G).

W = Gm. de muestra por c. c. de solución diluída. $\frac{100}{1,000} = \text{factor de conversión de megr. por Gm. a mg. por ciento.}$

El ácido ascórbico total incluye el ácido ascórbico como tal, el ácido dehidroascórbico, y el ácido dicetogulónico, si está presente.

Ejemplo de cálculo simple.

Se tomaron 200 Gm. de tomates enlatados.

200 Gm. de solución de ácido metafosfórico al 10%.

De esta masa se tomaron 20 Gm. y se diluyeron a 100 c. c.

Se emplearon 4 c. c. de solución para la formación del pigmento y la medida de la intensidad del color. Para la curva de calibración también se emplearon 4 c. c.

Lectura para la primera dilución, de 10 c.c. 56,0% T.

Lectura para la segunda dilución, de 5 c. c. 73,0% T.

Por interpretación sobre la curva de calibración, los valores de ácido ascórbico para las diluciones son: 4,9 mcgr. para la primera y 2,6 para la segunda. El valor de W para la primera dilución es:

$$\frac{200 \text{ Gm.}}{400 \text{ Gm.}} \times \frac{20 \text{ c. c.}}{10 \text{ c. c.}} \times \frac{10 \text{ e. c.}}{20 \text{ c. c.}} = 0,050$$

Por substitución de los valores de ${\bf R}$ y ${\bf W}$ en la fórmula tenemos que para la primera dilución:

$$\frac{4,9}{0,05} imes \frac{100}{1.000} = 0,08$$
 mgr. de ácido ascórbico total $imes$ 100 Gm.

El valor correspondiente para la segunda dilución, de 5 c. c. es 10.4 y el promedio de las 2 es $10.1 \text{ mg} \times 100 \text{ Gm}$ de ácido ascórbico total.

Los valores de ácido ascórbico obtenidos con las 2 soluciones no deben diferir más del 10%. En el caso contrario es necesario repetir la valoración. Si el valor obtenido con alguna de las 2 diluciones es considerablemente alto, se pone de manifiesto la presencia de materiales de interferencia diferentes del ácido ascórbico.

1. Extracción.

Se hace de la manera ya descrita en la técnica de determinación ácido ascórbico total. Se aconseja tomar 200 Gm. de muestra para con pensar las variaciones de contenido de ácido ascórbico dentro del producto. Luego proceder como sigue:

Análisis de ácidos dehidroascórbico y dicetogulónico.

Paso 1. La técnica no es adaptable a análisis de gran número muestras, porque puede originarse oxidación del ácido ascórbico e variación del contenido de los 3 ácidos. Para la mayoría de las frut frescas y vegetales se usan diluciones 1:100. Para materiales menos ric en vitamina C se usa dilución de 1:50.

No deben usarse diluciones menores de 1:50.

Colocar una cantidad pesada de la substancia a analizar, calculan que al diluírla 1:100 contenga de 5-10 mcgr. por c. c., en un mortero triturar con 1/20 del volumen final de ácido metafosfórico al 5% y su ciente cantidad de SnCl₂ seco para que el volumen de solución de met fosfórico agregado contenga un 10% de cloruro estannoso. Es importar que el líquido tenga un 10% de cloruro estannoso puesto que esta co centración preserva de la oxidación al ácido ascórbico y deja a los ácid dehidroascórbico y dicetogulónico inalterados. El peso del SnCl₂ agrado se calcula sobre la base del ácido metafosfórico agregado al morter Después de que la muestra es macerada, pasar el material a un matraforado y completar a la marca con ácido metafosfórico al 5%.

Puesto que la concentración final de SnCl₂, debe ser de 0,5% pa tener unas condiciones apropiadas para la copulación en pasos poster res, es necesario diluír 20 veces la solución anterior. Filtrar y proceccomo en D-3. Este procedimiento mide la cantidad de ácido dehidascórbico más el ácido dicetogulónico presente originalmente en muestra.

Con el objeto de aclarar las especificaciones presentadas arriba, ci mos un ejemplo:

Se tomaron 2 Gm. de muestra los cuales se diluyeron 1:100 has obtener la concentración deseada de 5-10 megr. de ácido ascórbico per c. c. Se colocó en un mortero y se trituró con 10 c. c. de ácido metaf fórico al 5% (1/20 de 200 c. c.) y 1.0 Gm de cloruro estannoso (10% 10 c. c.). Después de triturar se pasó a un matraz aforado y se complea volumen (200 c. c.) con ácido metafosfórico al 5%.

Paso 2. Determinación del ácido dicetogulónico.

Colocar 100 c. c. del filtrado del paso anterior en un Erlenmeyer y bacer burbujear ácido sulfhídrico a través de la solución, durante 15 minutos.

Agregar 0,4 Gm. de tiourea pulverizada a 40 c. c. de la solución trale con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se disuelva y filtrar. Burbujear CO₂ a

le con H₂S. Agitar hasta que se discido dicetogulónico de la con la con la c

Paso 3. Determinación de los ácidos ascórbico, dehidroascórbico y dicetogulónico.

Filtrar la parte restante de la solución del paso 1 en un tubo que permita hacer burbujeo de gas. Hacer pasar aire para remover el H_2S . Seguidamente proceder en la forma descrita en D-2 (a). Entonces agregar tiourea pulverizada en suficiente cantidad para que esté al 1%. Proceder luego en la forma descrita en D-3. Para disminuír al mínimo los cambios en el volumen, el aire debe pasar primero por una trampa para agua antes de pasar a través de la solución que contiene el H_2S .

Este procedimiento determina la cantidad de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y ácido dicetogulónico presente en la muestra.

CALCULOS

Calcular el contenido de ácido dehidroascórbico y ácido dicetogulónico según la fórmula:

$$rac{\mathbf{R}}{\mathbf{W}} imes rac{100}{1.000} = \mathrm{mg.}$$
 de ácido dehidroascórbico y de ácido dicetogulónico \times 100 Gm. de muestra.

en donde: los términos tienen el mismo significado que en la fórmula para el cálculo del ácido ascórbico total.

Calcular el ácido dicetogulónico de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{R}{W} \times \frac{100}{1.000} = \text{mg. de ácido dicetogulónico por } 100 \text{ Gm. } (2).$$

donde: R= equivalente de megr. de ácido ascórbico obtenido de la

lectura de la curva de calibración frente al valor correspondiente de %' (G) de la solución.

Calcular el contenido de ácido ascórbico, dehidroascórbico y ácid dicetogulónico de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{R}{W} \times \frac{100}{1.000} = \text{mg. de los 3 ácidos por 100 Gm. de muestra (3)}.$$

en donde: R = mcgr. de ácido ascórbico por c.c. obten:dos por lectur de la curva de calibración frente al correspondiente valor de %T (G de la solución.

En resumen, tenemos:

mg% de ácido dicetogulónico: se calculan según la fórmula (2 Los mg% de ácido dehidroascórbico: restando (2) de (1). Los mg. c ácido ascórbico reducido se obtienen restando (1) de (3).

Algunas consideraciones.

Este método resulta muy útil en la determinación del grado coxidación a que ha llegado el ácido ascórbico presente en un productualquiera, ya que permite valorar con bastante exactitud los ácido ascórbico reducido, dehidroascórbico y dicetogulónico.

Presenta además la ventaja de que permite determinaciones en pr ductos con coloraciones pronunciadas, que disminuyen por dilución, h ciendo posible una lectura bien aproximada de la coloración producida e el proceso de copulación con la 2,4 dinitrofenilhidrazina. Además, con se prepara un patrón, éste permite eliminar la interferencia de los pi mentos que son solubles en la solución ácida extractora, siempre y cuanc la cantidad presente no sea muy grande.

La concentración del ácido en las soluciones extractoras resulta mu apropiada para precipitar las proteínas presentes en cantidades apreci bles en varios productos, eliminando así un factor de interferenci ayudando a la clarificación de la solución analizada.

La temperatura a la cual tiene lugar la copulación que origina osazona de color rojo, elimina la posibilidad en desarrollo de coloración debidas a agentes distintos del ácido ascórbico.

La solución extractora original resulta muy apropiada para inhib la ácido ascórbico-oxidasa presente en productos con alto contenido o sólidos que la liberan en el proceso de homogenización, por rotura de l células. Dicha enzima es un factor determinante en la oxidación rápio del ácido ascórbico, y está directamente relacionada con el pH de la solición y la cantidad de agua presente en el producto.

El método resulta de precisión significativa: los análisis hechos en productos vegetales frescos (Opuntia ospinae, tunas recolectadas en la laguna de La Herrera), fueron comparados con los resultados obtenidos usando el método vodométrico y la diferencia fue del 0,5%. Con este material se presentó un fenómeno muy interesante: al agregar el bromo para oxidar el ácido ascórbico hasta ácido dicetogulónico, la coloración morado-rojiza pronunciada de la solución extractora desapareció y la solución se tornó incolora y transparente. La coloración fue apareciendo gradualmente con el tiempo pero el tono fue menos pronunciado y no interfirió en el análisis en grado significativo como lo demuestra el resultado obtenido. El fenómeno se debe probablemente a una reacción de óxido-reducción del pigmento soluble por acción del bromo y subsecuente eliminación de este por burbujeo de aire a través de la solución. Esto parece ampliar las posibilidades de su uso, para análisis de productos altamente coloreados, que contengan un pigmento capaz de sufrir una óxido-reducción con desaparición del color.

El equipo necesario es de uso corriente en un laboratorio de análisis, excepto el baño de agua con esas características. El método exige una manipulación ordenada y cuidadosa, puede resultar un poco lento y engorroso para un operador poco diestro, pero una vez elaborada la curva de calibración se elimina gran parte de las dificultades.

DETERMINACION DEL ACIDO ASCORBICO EN JUGO DE UVA NEGRA Y OTROS JUGOS COLOREADOS (25)

El método se basa en la reducción cuantitativa del cloruro mercúrico a cloruro mercurioso por acción del ácido ascórbico presente en el jugo de uva negra y en otros jugos coloreados. El cloruro mercurioso insoluble se separa por centrifugación y se disuelve en una solución tipo de yodo, el exceso del cual se titula con una solución tipo de tiosulfato de sodio, usando almidón como indicador. Los resultados obtenidos por este método se comparan con los obtenidos por el método de titulación potenciométrica. El sulfito de sodio, ácido cítrico, glucosa, sacarosa y otras substancias normalmente presentes en esos jugos, no causan interferencia.

Se ha visto que la adición de sulfito a los jarabes de jugos de frutas no previene la pérdida de ácido ascórbico, particularmente en especímenes que han sido expuestos a la luz o almacenados por largos períodos de tiempo.

Los métodos corrientes que utilizan el cambio de color como indicador no son apropiados para estos productos porque tienen una coloración muy pronunciada. Evered (26) tituló el ácido ascórbico prese en jugo de uva negra usando N-bromosuccinimida, detectando el pu final por la liberación de yodo, y extrayendo el yodo con un solve orgánico. El punto final, que presenta una coloración parda en la ca del solvente orgánico, es difícil de establecer cuando se mira sobre fondo rojizo de la capa acuosa. Schamall, Pifer y Wollish (27) ł propuesto el uso de la 4, metoxi 2 nitroanilina diazotada que produce color azul con el ácido ascórbico en medio alcalino. Ellos han reporta el uso de este método de valoración en análisis de jugos de frutas co naranja, toronja y tomate. Sin embargo, Johannesen (28) y Berge (29) encontraron que es necesario separar el ácido ascórbico por cror tografía sobre papel antes de que pueda aplicarse el método de análi colorimétrico a extractos de frutos de rosal y extractos de uva neg Un método corrientemente usado se basa sobre la primera titulación tenciométrica descrita en 1926 por Foulk y Bawden (30). Liebmar Ayres (31), adaptaron esta técnica para determinación de ácido asc bico por titulación con 2,6 diclorofenolindofenol. Este método es prec pero muy laborioso, la solución del colorante es inestable y es necesa titularla cada vez que va a utilizarse.

La reducción cuantitativa del cloruro mercúrico a cloruro mercuripor el ácido ascórbico ha sido investigada por Suryanarayana R Veerexwara Rao y Gopala Rao (32). Este procedimiento parece ser ap piado para determinar ácido ascórbico en soluciones coloreadas y I esto ha sido adaptado como base para la determinación de ácido asc bico en jugos de frutas, coloreados.

PROCEDIMIENTO

Transferir una cantidad medida o pesada aproximadamente, i jugo que se analiza, calculando que contenga de 5-10 mg de ácido asc bico, a un tubo de centrífuga de 50 c. c. de capacidad, que contiene 5 c de solución saturada de cloruro mercúrico y 10 c. c. de acetona. Agir la solución con una varilla de vidrio y lavar la varilla con agua. Despu de dejar la solución en reposo durante 30 minutos, centrifugarla a 2.5 RPM durante 10 minutos en un radio de 15.0 cm. Remover cuidado mente con una pipeta, la capa sobrenadante, lavar el cloruro mercurio precipitado con 20 c. c. de ácido acético al 10%, caliente, y centrifug la solución durante 10 minutos. Remover el líquido sobrenadante c una pipeta y transferir cuantitativamente el cloruro mercurioso a matraz de 250 c. c. con agua. Disolver el cloruro mercurioso por adici de 25 c. c. de solución de yodo 0.01 N y 5 c. c. de solución de yoduro potasio al 10%. Titular el exceso de yodo con la solución de tiosulfa

— 36 —

de sodio 0,01 N usando almidón como indicador. Hacer los cálculos utilizando la fórmula:

1 c. c. de yodo 0,01 N = 0,88 mg. de ácido ascórbico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Comparación de resultados.

Los autores analizaron 19 muestras de varios jugos comerciales, usando el método propuesto y el método de Liebman-Ayres con 2,6 diclorofenolindofenol como titulante. Los resultados se presentan en la Tabla 1. Puede verse que en general el método propuesto da resultados que están muy cercanos a los obtenidos por el método de titulación potenciométrica.

(Ver Tabla I) $\begin{tabular}{ll} $\mathsf{T} \ \mathsf{A} \ \mathsf{B} \ \mathsf{L} \ \mathsf{A} & \mathsf{I} \end{tabular}$ COMPARACION DE RESULTADOS

			RBICO EN MG./OZ.		
Nº de determinaciones	METODO PI		Titulación potenciométrica		
por el método propuesto	Intervalo	Promedio	Promedio de 2 titulaciones		
Jugo de uva negra:					
10	58,3-60,2	59,4	58,6		
10	43,7-45,5	44,8	44,8		
10	25,8-27,2	26,5	26,8		
6	37,8-39,1	38,6	38,2		
6	38,6-40,3	39,7	39,7		
4	41,8-43,0	42,6	42,6		
4	11,6-13,1	12,3	11,2		
4	15,7-16,2	15,9	15,6		
4	9,6-10,2	9,8	9,6		
4	8,1- 9,0	8,3	5,1		
3	49,9-50,4	50,2	50,4		
3	41,5-42,8	42,1	40,7		
Guayaba y toronja:					
4	34,7-36,1	35,0	35,4		
4	30,7-31,8	31,6	30,9		
4	11,2-11,8	11,4	11,7		
$3_{\scriptscriptstyle{\parallel}}$	21,8-22,2	22,0	22,1		
3	5,1- 5,8	5,3	2,6		
Otros tipos de jugos:					
4	33,0-34,3	33,6	33,6		
4	36,7-37,5	37,0	36,7		

Cada línea horizontal de resultados corresponde a una muestra diferente. Con muestras viejas de bajo contenido de ácido ascórbico, las diferencias entre los valores obtenidos por los dos métodos, fueron mayores. Es posible que ciertas substancias presentes en las muestras puedan haber interferido, dando de esta manera resultados más altos.

Debe mencionarse que se encontró dificultad para determinar el punto final en la titulación electrométrica de estas muestras.

Las cantidades extremadamente bajas de ácido ascórbico rara vez se toman en consideración y una diferencia de 3 mg. de ácido ascórbico por onza fluída de jarabe es de poca importancia práctica.

(Ver Tabla II).

	Núm ro de	ACIDO AS	CORBICO MG/0Z	DE JUGO
Especimen	determinaciones	Intervalo	Promedio	Desviación Tipo
1	10	58,3-60,2	59,4	0,57
2	10	43,7-45,5	44,8	0,54
3	10	25,8-27,2	26,5	0,46

Precisión del método.

Los autores realizaron un estudio sobre la precisión del método. Las desviaciones tipo se presentan en la Tabla II. Estas son bastante satisfactorias para la mayoría de los fines. Se recomienda el uso de pipetas de vaciado o que la muestra se tome en peso en lugar de tomarla en volumen, ya que es poco aconsejable el uso de pipetas ordinarias para la medida de líquidos viscosos como los jugos de frutas, en casos de trabajos de precisión.

Recuperación del ácido ascórbico agregado.

A 3 c. c. de jugo de uva negra, se agregaron cantidades conocidas de ácido ascórbico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III. Como puede verse en dicha Tabla, las cantidades adicionadas varían entre 1 y 5 mg. y que estas cantidades pueden recuperarse con un error de más o menos 2%.

(Ver Tabla III).

TABLA III

RECUPERACION DE ACIDO ASCORBICO EN JUGO DE UVA NEGRA, POR EL METODO PROPUESTO

ACIDO	ASCORRICO	FN MC

Agregado a 3 cc. de jugo	Encontrado	Promedio	Recuperado	Recuperado %
0	4,53 4,46	4,50		_
1	5,49 5,46	5,48	0,98	98,0
2	6,39 6,57	6,48	1,98	99,0
3	7,48 7,52	7,50	3,00	100,0
4	8,44 8,49	8,47	3,97	99,25
5	9,50 9,54	9,52	5,02	100,4

Orden de adición de los reactivos.

Es importante que el jugo se adicione sobre el cloruro mercúrico y no al contrario. Esto con el fin de prevenir que haya siempre un exceso de cloruro mercúrico e impedir así la formación de mercurio metálico por reacción entre el cloruro mercurioso formado y un exceso de ácido ascórbico. Más tarde es esencial que la solución de yodo se agrega al cloruro mercurioso antes del yoduro potásico.

Si se sigue en orden inverso pueden obtenerse resultados menores debido a la reducción del cloruro mercurioso hasta mercurio metálico por acción del yoduro de potasio, de acuerdo a las siguientes reacciones:

$$Hg_2Cl_2 + 2KI \longrightarrow Hg_2Iz_2 + 2KCI \dots (1)$$

$$Hg_2I_2 + 2KI \longrightarrow K_2HgI_4 + Hg^{\stackrel{\circ}{2}} \dots (2)$$

Debe seguirse un correcto orden de adición de los reactivos con el objeto de asegurar la exactitud y que los resultados sean reproducibles.

Efectos del pH.

Suryanarayana Rao, Veerexwara Rao y Gopala Rao, reportaron qu el margen óptimo en el cual el ácido ascórbico reduce cuantitativament al cloruro mercúrico, está comprendido entre 2,0-8,0.

El pH de las muestras estudiadas fluctuó entre 2,2 y 3,0. La adició de acetona y cloruro mercúrico no alteran el pH de ninguna de las muestras citadas, en más de 0,5 unidades de pH. Como el pH de las solucione estudiadas se mantuvo dentro de los límites aconsejables, los autores n utilizaron solución tampón.

Interferencia de otras substancias.

El ácido cítrico, la glucosa y la sacarosa no interfieren en el métod propuesto. Tampoco interfieren un exceso de ácido acético o de clorur mercúrico.

Debido a que el sulfito de sodio se utiliza especialmente como pre servativo, se estudió el efecto de éste sobre el método propuesto y llega ron a la conclusión de que cantidades mayores de 16 mg. de sulfito, n presentan interferencia cuando se agregan a 1 c. c. de jugo.

Las trasas de metales como plomo y hierro tampoco presentan in terferencia, pero los iones cúpricos y férricos y otros agentes oxidante destruyen el ácido ascórbico.

La proximidad de los datos obtenidos por este método y los obtenido por el método de titulación potenciométrica permite deducir la especificidad de los reactivos utilizados en las condiciones descritas. La posibilidad de que substancias diferentes al ácido ascórbico puedan reduci el cloruro mercúrico, no puede excluírse completamente en esas condiciones, especialmente si se trata de productos viejos. El análisis de mues tras que han sido tratadas con ácido ascórbico-oxidasa, usando el método propuesto, puede proporcionar claridad a este punto.

Separación del cloruro mercurioso de la solución.

Se recomienda separar el cloruro mercurioso precipitado, por cen trifugación. El precipitado es pesado y la separación puede resultar fácil si se hace por este método. Los intentos hechos para separarlo por filtración han resultado infructuosos debido al tamaño de las partículas y a la viscosidad del líquido.

Ventajas del método.

El método propuesto puede ser adaptado para análisis de rutina es simple y seguro. La precipitación y centrifugación puede hacerse en reactivo o aparatos especiales. Puede aplicarse además a la determinación de ácido ascórbico en jugos de uva negra, guayaba y toronja y en otros tipos de jugos de frutas sintéticos. Es posible que un analista complete el análisis de 20 o 25 muestras en un solo día trabajando 6 y media horas.

EL ACIDO ASCORBICO EN LOS ENLATADOS

Para examinar el papel que juega el ácido ascórbico en los enlatados, especialmente en productos tales como jugos, néctares, frutas en su jugo, pasta, etc., es necesario tomar en consideración muchos factores como son: cantidad de ácido ascórbico presente en la materia prima, y en el enlatado, influencia del proceso de fabricación sobre la estabilidad del ácido ascórbico, factores de estabilidad como son: tiempo de almacenamiento, efecto de corrosión, presencia de enzimas, grado de vacío, etc.

Nos permitimos discutir los más importantes.

1. El ácido ascórbico en la materia prima.

La cantidad de ácido ascórbico presente en productos vegetales como tomates, peras, guayabas, piñas, naranjas, limones, manzanas, durazno, lulo, mango, etc., depende de muchos factores, entre otros del grado de madurez, de la especie, del terreno, de las condiciones de almacenamiento y de transporte.

Puede decirse en términos generales que la cantidad de ácido ascórbico presente en una fruta aumenta con el grado de madurez. Los análisis hechos en guayabas dieron los siguientes resultados:

Producto	Estado de madurez	Acide ascórbico mg. x 100 Gm.	Peso promedio de la guayaba	Acido ascórbico por fruta
Guayaba rosada	Avanzado	91,6	59,5 Gm.	54,5 mg.
Guayaba rosada	Verde	80,2	62,9 Gm.	50,5 mg.

Nota: Las guayabas maduras presentaban algunas lesiones, debidas a golpes durante la recolección o el transporte. Como puede observarse en los datos presentados en el cuadro anterior, las guayabas maduras exhiben un mayor contenido de ácido ascórbico a pesar de las lesiones anotadas. Las guayabas fueron recolectadas en el mismo lugar y proce-

dían de la misma cosecha. Se mantuvieron en refrigerador antes de proceder al análisis, con el fin de evitar la acción de la ácido-ascórbico-oxidasa, la degradación microbiana y el deterioro de la fruta. Presumiblemente la cantidad de ácido ascórbico presente en la fruta aumenta con la madurez hasta cierto punto experimentado después de una disminución.

2. Tiempo de almacenamiento.

Este es un factor que influye notablemente sobre la cantidad de ácido ascórbico presente en un enlatado. Puede decirse en términos generales que disminuye a medida que se prolonga el almacenamiento. Es un factor que debe tenerse en cuenta para asegurar al consumidor que el enlatado contiene una cantidad apreciable del producto vitamínico. El tiempo de estabilidad está directamente relacionado con otros factores como el pH, el contenido hídrico, la presencia de preservativos, secuestrantes, temperatura, y la misma naturaleza del producto. Más adelante presentaremos un estudio hecho sobre jugos de frutas en el que se relacionan todos estos factores.

Los datos obtenidos en análisis hechos sobre jugo de guayaba enlatado mantenido a diferentes temperaturas, pueden apreciarse en la tabla siguiente:

Producto		Temperatura almacenamiento °C Días		Acido ascórbico mg. x 100 Gm.	Pérdidas mg. x 100 Gm.		
Jugo	de	guayaba	enlatado.	18	0	36,35	Magniferrore
Jugo	de	guayaba	enlatado.	18	15	34,05	2,30
Jugo	de	guayaba	enlatado.	18	30	30,80	5,55
Jugo	de	guayaba	enlatado.	37	15	30,30	6,05
Jugo	de	guayaba	enlatado.	37	30	28,50	7,85

TABLA IV

Las muestras empleadas para los experimentos fueron tarros de jugo de guayaba de 6 onzas. Todos los tarros cumplían con los requerimientos respecto de vacío, cierres, etc. El método utilizado para el análisis fue el de la 2,4 dinitrofenilhidrazina.

Los valores de pH oscilaron entre 3-4. Los tarros mantenidos a temperatura ambiente no presentaron cambios notables en el color ni en el olor. Los mantenidos a 37°C presentaron cambios más o menos marcados en el color, con aparición de colores oscuros hacia el final del período y con aparición de sabores y olores desagradables. Como puede apreciarse en la tabla anterior, las pérdidas experimentadas por el producto fueron

mayores a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento y la temperatura del mismo, de tal manera que las pérdidas experimentadas por almacenamiento a 37°C durante 15 días representan casi el triple de las pérdidas experimentadas por el mismo producto en 15 días de almacenamiento a 18°C.

Presentamos a continuación una tabla con los datos obtenidos por análisis de jugos de piña y de guayaba de diferentes edades:

TABLA V

Producto	Temperatura	Tiempo	Acido ascórbico mg. x 100 Gm.
Jugo de guayaba	18°C	15	27,4
Jugo de guayaba	$25^{\mathrm{o}}\mathrm{C}$	5	26,7
Jugo de guayaba	$18^{ m oC}$	8	36,35
Jugo de piña	$18^{ m oC}$	7	26,10

De los experimentos consignados en la tabla que relaciona la pérdida de ácido ascórbico con el tiempo y la temperatura de almacenamiento pueden sacarse las siguientes conclusiones:

- 1. La pérdida del ácido ascórbico aumenta con el tiempo de almacenamiento y con la temperatura.
 - 2. Esta destrucción o inactivación no guarda una relación simple.
- 3. La pérdida de ácido ascórbico aumenta con el tiempo presumiblemente por la presencia de los productos provenientes de la degradación del mismo.
- 4. La temperatura influye notablemente sobre el estado de corrosión en el interior del tarro lo que a su vez influye en forma determinante sobre la inactividación o destrucción del ácido ascórbico. En los enlatados mantenidos a 37°C se observaron más señales de corrosión representadas por líneas delgadas circulares y longitudinales más abundantes y marcadas y escamas más abundantes y marcadas que en los tarros mantenidos a la temperatura ambiente (18°C).
- 5. La temperatura influye notablemente en los cambios de color, que son más acentuados en los enlatados mantenidos a 37°C. Esto se debe seguramente a un mayor deterioro del ácido ascórbico y los azúcares presentes en el producto, con aparición de productos coloreados como ya se explicó al hablar de las reacciones de obscurecimiento.
- 6. Puede decirse en términos generales que la reacción de inactivación del ácido ascórbico es mayor con el tiempo porque los productos

provenientes de su degradación catalizan la reacción posterior hasta un mayor grado.

La influencia que sobre la estabilidad del ácido ascórbico tienen la temperatura de almacenamiento, el tiempo de almacenamiento, el pH, la presencia de preservativos y secuestrantes, la naturaleza del vehículo y el espacio libre en la parte superior del recipiente puede evidenciarse con el estudio hecho por M. C. Uprety y Brevis, sobre la estabilidad del ácido ascórbico en ciertos jugos de frutas y en vehículos acuosos (33).

Los estudios se hicieron a diferentes valores de pH comprendidos entre 2,5-7-6,5 a 37°C y a 55°C en presencia de 0,2% de ácido cítrico, 0,01 de EDTA, 0,01% de galato de propilo, 0,2% de sulfato ferroso, 0,2% de clorhidrato de cisteína y 0,2% de metabisulfito de potasio. El jugo de lima con glicerol y sorbitol en proporción de 2:2:1 retuvo el 70% de ácido ascórbico a pH 6,5 después de 120 días. El ácido cítrico también protegió el ácido ascórbico.

La pérdida de ácido ascórbico en soluciones acuosas con algunos valores de pH fue contrarrestada con 0.9% de cloruro de sodio. El sulfato de dihidroestreptomicina en concentraciones de 0,33 mg. x c. c. protegió al ácido ascórbico en todos los valores de pH excepto a pH 6,5 a 37°C y a pH 5,5 a 55°C, en cuyos casos se notó un efecto destructivo.

Se estudió la estabilidad del ácido ascórbico a 37°C y a 55°C, empleando ciertos jugos de frutas como bases, algunos de los cuales se emplearon posteriormente junto con algunas otras formulaciones.

El estudio se realizó a altas temperaturas puesto que cualquier mezcla multivitamínica líquida que resulte estable a temperaturas más altas, mantiene su calidad por un largo período de tiempo a temperaturas correspondientemente bajas (34). Esta observación de Garret ha sido confirmada por McLeod y colaboradores (35), Uprety y colaboradores (36), y recientemente por Agrawal y colaboradores (37).

Esas pruebas a altas temperaturas podrían usarse también para predecir la estabilidad a la temperatura ambiente, disminuyendo así el tiempo que normalmente se gasta para estudios de estabilización en almacenamiento o temperatura ambiente.

Ellos realizaron un experimento separado con una solución acuosa de ácido ascórbico a la temperatura ambiente, 37°C, 55°C, para estudiar la velocidad de destrucción del ácido ascórbico y para descubrir si podría desarrollarse una fórmula estable y concluír la estabilidad del mismo con la temperatura y el pH. Los estudios se continuaron por 3 meses o hasta que la retención de vitamina decayó por debajo del 30%.

La vitamina utilizada fue suministrada por F. Hoffmann La Roche Co. Ltd. de Basilea, Suiza.

Vehículos.

Se utilizaron jugos de frutas, sorbitol (E. Merck) y glicerina (B. D. H.).

Las formulaciones empleadas se presentan en la Tabla I.

A una someión de ácido ascórbico que contenía 5,0 mgr x c.c. se agregó un vehículo que contenía 0,2% (W/V) de p-hidroxibenzoato de metilo (Rhodia France). Después de ajustar el pH requerido, se envasaron las preparaciones en frascos ámbar de 2 onzas de capacidad, con tapa de vidrio, y se mantuvieron en incubadoras a 37°C y 55°C.

El método utilizado para el análisis fue el del 2,6 diclorofenolindofenol.

Antioxidantes.

Los antioxidantes examinados en relación con su efecto sobre la estabilidad del ácido ascórbico en una solución acuosa fueron: galato de propilo (Ward Blenkinsop and Co. Ltd. London, England), ácido etilendiaminotetracético EDTA, metabisulfito de potasio KMS (E. Merck), gluconato ferroso (Nila Products, Ltd. Bombay, India), y ácido cítrico (B. D. H.). Las concentraciones de esos antioxidantes y otras formulaciones se presentan en la Tabla VI.

Después de ajustar el pH, se colocó una solución de 0,5% de ácido ascórbico en tubos de ensayo de vidrio pirex (6 x ¾ de pulgada) y mantenidos a 37°C y a 55°C. Los tubos de ensayo se cerraron con tapones de caucho. Las muestras se analizaron periódicamente con el objeto de recopilar y relacionar los cambios en la retención del ácido ascórbico. Se hizo un experimento similar utilizando como vehículo solución salina fisiológica. Se examinó el efecto del sulfato de dihidroestreptomicina en concentraciones de 0,33 mg x c. c. en solución acuosa, a 37°C y a 55°C, en un intervalo de pH comprendido entre 2.5 y 6,5.

Resultados.

El ácido ascórbico de las soluciones preparadas con agua destilada obtenida en destilador de vidrio, se perdió completamente al cabo de 60 días, mantenidas a 37°C y a 55°C en el control y en presencia de 0,02% de EDTA, 0,01% de galato de propilo, 0,02% de gluconato ferroso, 0,02% de clorhidrato de cisteína y 0,2% de ácido cítrico, en todos los valores de pH comprendidos entre 2,5 y 6,5, aunque una de concentración de KMS de 0,2% protegió al ácido ascórbico a pH 3,5 (37°C) a una extensión del 65%, seguido por 0,02% de EDTA el cual dio una protección ligeramente superior al 30% a pH 2,5.

 $$\rm T~A~B~L~A~V~I$$ % DE RETENCION DE ACIDO ASCORBICO, TEMPERATURA 37°C

Nº	Vehículo	Antioxidante o secuestrante	Días	2.5	3.5	4.5	5.5	6.5
1	Jugo de piña	Control	60	60.00	28.9	2.8	49.3	52.5
2	Jugo de manzana	Control	60	1.43	1.40	1.43	1.45	35.0
3	Jugo de limón	Control	30	38.3	24.0	8.3	3.0	17.2
4	Jugo de limón-glicerina-sorbitol 2:2:1.	Control	$72 \\ 120 \\ 48$	$29.4 \\ 20.3 \\ 44.8$	$61.4 \\ 44.2 \\ 59.2$	75.4 47.4 53.5	75.4 45.2 43.6	$89.6 \\ 70.0 \\ 21.8$
5	Jugo de manzana con 75% (W/V) glicerina	Control	79	37.0	32.0	20.0	15.4	2.6
6	Jugo de manzana	0.01% EDT A	72	Nada	66.6	48.1	Nada	Nada
7	Jugo de manzana	0.01% galato de propilo	72	Nada	68.74	79.3	Nada	88.4
8	Jugo de manzana	0.02% ácido cítrico	$\begin{array}{c} 64 \\ 105 \end{array}$	34.2 Nada	$\begin{array}{c} 41.04 \\ 20.6 \end{array}$	$\frac{34.2}{17.5}$	$21.1 \\ 17.5$	$\begin{array}{c} 95.2 \\ 36.1 \end{array}$
9	Jugo de manzana	0.2% gluconato ferroso .	60	2.3	2.3	2.3	7.0	22.4
10	Jugo de manzana 75% (W/V) glicerina (1:1)	0.02% EDTA	49 79	67.7 53.7	$58.2 \\ 33.3$	42.0 17.0	42.8 29.4	$61.1 \\ 44.9$
11	Jugo de manzana 75% (W/V) glicerina (1:1)	0.02% propilo galato	46 63	$58.3 \\ 43.2$	$56.8 \\ 43.3$	$\begin{array}{c} 33.5 \\ 20.4 \end{array}$	$\begin{array}{c} 36.1 \\ 25.4 \end{array}$	$\begin{array}{c} 28.1 \\ 10.2 \end{array}$

TABLA VII

N ⁰	Vehículo	Antioxidante o secuestrante	Días	2.5	3.5	4.5	5.5	6.5
1	Jugo de piña	Control	60	2.5	4.8	3.2	3.8	5.0
2	Jugo de manzana	Control	60	3.0	3.0	3.0	3.0	1.5
3	Jugo de limón	Control	30	10.6	6.7	2.7	3.0	2.8
4	Jugo de limón - sorbitol - glicerina (2:2:1)	Control	72 120	$27.3 \\ 6.4$	36.8 5.7	Nada Nada	$\begin{matrix} 30.1 \\ 5.1 \end{matrix}$	40.2 Nada
5	Jugo de manzana 75% (W/V) glicerina 1:1	Control	48	9.4	16.4	2.3	2.3	12.2
6	Jugo de manzana	0.01% EDTA	72	Nada	10.6	Nada	Nada	34.2
7	Jugo de manzana	0.01% propilo galato	72	Nada	Nada	Nada	41.6	Nada
8	Jugo de manzana	0.2% cítrico	64	2.7	2.7	2.7	2.7	5.5
9	Jugo de manzana	0.2% gluconato ferroso.	60	2.3	2.3	4.7	4.7	4.8
1 ●	Jugo de manzana 75% (W/V) glicerina	0.2% EDTA	49	36.0	13.6		2.3	2.3
11	Jugo de manzana 75% (W/V) glicerina	0.2% galato de propilo.	46	5.16	5.16	2.58	2.58	2.58

Después de 120 días de almacenamiento el KMS en la concentración usada no tiene efecto protector sobre el ácido ascórbico.

La Tabla VI muestra que a 55°C con un período de almacenamiento de 60 días, el ácido ascórbico es oxidado en su totalidad, excepto con el vehículo compuesto de jugo de limón, sorbitol y glicerina en proporciones 2:2:1, en el cual hubo una retención del 30% a pH 2,5, 3,5 y 5,5 y 40% a pH 6,5. Las muestras mantenidas a esta temperatura presentaron cambio de color hacia el pardo oscuro. La inclusión de antioxidantes (cuya concentración se muestra en la Tabla I) impide predecir la estabilidad del ácido ascórbico.

En el jugo de manzana el ácido ascórbico fue prácticamente degradado en su totalidad al cabo de 60 días a 37°C a pH de 2,5, 5,5, pero se observó una retención del 35% a pH 6,5. La adición de 0,01% de EDTA estabilizó el ácido ascórbico a pH 3,5 con una retención del 66% y a pH 4,5 con una retención del 48%.

A otros valores de pH no se notó ninguna protección. El galato de propilo en concentración al 0,1% también protegió el ácido ascórbico a pH 3,5, 4,5 y 6,5.

El ácido cítrico, en términos generales, protegió la vitamina C en el jugo de manzanas a 37°C en la concentración usada.

El gluconato ferroso no pareció tener influencia sobre la retención de ácido ascórbico en el jugo de manzana a 37ºC dentro de los valores de pH contemplados en el experimento.

El vehículo compuesto por jugo de manzana, glicerina en proporción de 1:1 resultó ser mejor vehículo que el jugo de manzana solo a pH 5,5. La adición de EDTA al vehículo glicerinado mostró mejor estabilidad a pH 2,5, 5,5 y 6,5. El galato de propilo (0,02%) no tuvo efecto sobre la estabilidad del vehículo 5.

El jugo de piña resultó mejor que el de manzana o el de limón, como vehículo para el ácido ascórbico.

Al cabo de 120 días el vehículo compuesto por jugo de limón, sorbitol y glicerina (2:2:1) mostró el 70% de retención de ácido ascórbico a 37°C mientras que a pH 3,5, 4,5 y 5,5 la retención fue de cerca de 45%. A pH 2,5 la retención en este vehículo fue pobre.

Temperatura ambiente.

Examinando los datos de la Tabla VII se ve que la mayor retención de ácido ascórbico tiene lugar a pH 3,5 y la máxima degradación a pH 5,5 y al cabo de 50 días. A los otros niveles de pH se presenta cerca del 60% de destrucción. La descomposición del ácido ascórbico en la solución salina fisiológica sigue el mismo patrón que en el agua destilada,

a todos los niveles de pH excepto a 5,5 que presenta una acción protectora.

A 37°C.

Cerca del 75% del ácido ascórbico se perdió después de 40 días, en agua destilada a los diferentes niveles de pH excepto a pH 3,5. La máxima destrucción ocurre a pH 2,5 y la mínima a pH 3,5. En solución salina fisiológica la máxima destrucción tiene lugar a pH 5,5 y la mínima a pH 3,5. El cloruro de sodio en concentración del 0,9% a pH 2,5 promovió la estabilidad. Con otros valores de pH la solución salina fisiológica no tiene influencia sobre la estabilidad, dentro de los límites de error experimental.

La adición de sulfato de dihidroestreptomicina en concentración de **0,33** mg./cc. a la solución acuosa de ácido ascórbico tiende a aumentar **la** estabilidad a pH 5,5 pero a pH 6,5 esta concentración presenta un **efe**cto perjudicial.

▲ 55°C.

A esta temperatura, se había perdido cerca del 70% del ácido ascórbico en la solución acuosa al cabo de 30 días. La destrucción aumentó cuando el pH se elevó por encima de 4,5, sin embargo a pH 5,5 parece tener un valor crítico, la retención es regularmente buena hasta una extensión de cerca del 52%.

A pH 6,5 se presentó la pérdida total del ácido ascórbico al cabo **de** 20 días.

En solución salina fisiológica en las mismas condiciones se observó una mayor estabilidad a pH 6,5. Esta no parece tener influencia a otros valores de pH.

El sulfato de dihidroestreptomicina en la concentración usada, tuvo un efecto estabilizante sobre el ácido ascórbico a todos los niveles del pH excepto a pH 5,5 en que se notó un efecto perjudicial después de un período de 40 días en agua destilada.

No se notaron cambios de pH en el período de experimentación a pesar de que no se utilizaron soluciones tampones. Todas las muestras que contenían ácido ascórbico desarrollaron color.

El mayor grado de coloración se presentó en las muestras que contenían ácido ascórbico. La intensidad del color producido resultó ser proporcional al grado de descomposición de ácido ascórbico.

Discusión.

La estabilidad del ácido ascórbico, evidenciada por este estudio, es función del pH y la temperatura. A pH 2,5 la estabilidad decrece marcadamente. Este hallazgo está sustentado por Ganguly (38) quien demostró que a pH bajo el aire y los iones cúpricos disminuyen la estabilidad de una solución acuosa de ácido ascórbico.

Es interesante que el metabisulfito de potasio estabiliza el ácido ascórbico. Este hallazgo confirma nuestros anteriores descubrimientos y también presta fuerza al punto de vista de Schoeter (39). Es esencial que se agregue una concentración adecuada de este antioxidante porque el mecanismo de protección del ácido ascórbico depende de la cantidad de iones bisulfito disponibles.

El EDTA en una concentración de 0,2% también dio alguna pro tección al ácido ascórbico en solución acuosa. Este descubrimiento esté de acuerdo con el de Bartilucci y Foss (40) y también con el de Ch'er (41). Probablemente la concentración usada en la presente investigación fue más baja y es un factor que cuenta en la estabilidad reducida.

Los otros antioxidantes utilizados no ofrecieron protección al ácido ascórbico en solución acuosa, o porque las concentraciones resultaron insuficientes o porque las muestras fueron analizadas después de un almacenamiento por un largo período de tiempo.

A 55°C se destruyó la mayoría del ácido ascórbico. Este descubri miento muestra claramente que a temperaturas elevadas la oxidación e rápida. Una preparación que puede ser estable a 55°C por un mes de bería ser teóricamente estable por 5-6 meses a 25°C.

Esto puede disminuír el tiempo que usualmente se gasta en el estu dio analítico a la temperatura ambiente, si los estudios se hacen par estabilizar una preparación vitamínica líquida.

El vehículo compuesto de jugo de limón-sorbitol-glicerina (2:2:1 a pH 6,5 mostró una retención del 40% a 55°C. Por lo tanto, este vehículo presentó la máxima protección entre todos los vehículos estudiados aun sin la ayuda de un antioxidante. Nuestros anteriores de cubrimientos respecto de las mezclas de jugo de limón-sorbitol (1:1) el jugo de limón-glicerina (1:1) nos permiten concluír que son bueno vehículos para el ácido ascórbico, conclusiones éstas que han sido cor firmadas y modificadas con la inclusión de la glicerina en este estudia La retención del ácido ascórbico en este vehículo a 55°C es aproximada mente equivalente al tiempo de retención del mismo por un año a la ten peratura ambiente.

En el jugo de manzana a pH 5,5 y a 37°C el ácido ascórbico fu degradado completamente. Esto puede explicarse por el hecho de que

jugo de manzana, probablemente contiene una alta proporción de polifenol-oxidasa que cataliza la oxidación del ácido ascórbico.

La adición de 0,01% de EDTA, protegió el ácido ascórbico a pH 3,5 y 4,5. Esta protección puede explicarse por el hecho de que los iones **Cu++** son fijados o secuestrados con formación de un "chelato" que **pide** su acción perjudicial sobre el ácido ascórbico.

El galato de propilo también exhibió acción protectora a pH 3,5, 4,5 y 6,5, lo que está de acuerdo con lo encontrado con Ch'en.

El ácido cítrico en las concentraciones usadas, protegió el ácido escórbico a todos los valores de pH. Presumiblemente existe una clase inhibición competitiva lo cual puede explicar el mecanismo por el el ácido cítrico estabiliza el ácido ascórbico.

La sustitución del 50% del jugo de manzana por glicerina, mejora estabilidad del ácido ascórbico a pH 5,5 y a 37°C. Esto concuerda con encontrado por Bandelin y Tuschoff (42), quienes demostraron que la dición de alcoholes polihidroxilados tienden a producir efecto establizante.

El jugo de piña mostró una buena estabilidad a 37°C comparado en el jugo de limón, probablemente porque el de piña puede contener enos ácido ascórbico-oxidasa o iones metálicos perjudiciales para el écido ascórbico.

El ácido ascórbico mostró 70% de retención en el vehículo Nº 4 compuesto de jugo de limón, sorbitol-glicerina (2:2:1) después de 4 meses a pH 6,5. Esto concuerda con lo encontrado por Bartilucci y Foss quienes demostraron que el pH óptimo de estabilidad del ácido ascórbico en solución está entre 6,0-7,0.

La solución acuosa de ácido ascórbico a la temperatura ambiente mostró que la máxima retención se presenta a pH 3,5 y la máxima degradación a pH 5,5. Esta acción de deterioro por parte del pH se contrarrestó con la adición de 0,9% de cloruro de sodio. Se hizo un patrón similar a 37°C.

La acción destructora a pH 3,5 a 37°C fue contrarrestada igualmente con solución salina fisiológica. Esto demuestra que el cloruro de sodio al 0,9% es efectivo para contrarrestar el efecto adverso del pH y de la temperatura en las soluciones acuosas, lo cual tiene algo que ver con el equilibrio iónico en una solución acuosa. Puede deducirse también que la presencia de cloruro de sodio en productos como la pasta de tomate tiene un efecto protector sobre el ácido ascórbico.

La destrucción que tiene lugar en una solución acuosa mantenida a 55°C aumentó al elevar el pH. Esto coincide con lo expuesto por Bandelin y Tuschoff, quienes demostraron que la velocidad de descomposición oxidativa de una solución de ácido ascórbico aumenta al aumentar el pH. Sin embargo, no puede darse una explicación satisfactoria la retención del 30,7% a 55°C después de un período de 30 días.

Por otra parte a pH 6,5 el cloruro de sodio al 0,9% resultó efectiv para contrarrestar la oxidación del ácido ascórbico.

El ácido cítrico en la concentración usada volvió pardo el vehícu que contenía el ácido ascórbico. Esto también ha sido demostrado por Lamden y Harris (43), quienes establecieron que el agua de cristalización del ácido cítrico promueve el obscurecimiento a 49°C. En efectodas las muestras se volvieron de color pardo pero la intensidad difer y el máximo se observó en las que contenían ácido cítrico.

Varios investigadores (33, 36), han demostrado que el azufre e forma de cisteína, metionina, y metabisulfito de potasio ejerce una acció estabilizadora sobre el ácido ascórbico. La estabilidad desarrollada debe probablemente al azufre. El mecanismo incluye probablemente formación de un puente libre entre el S y los iones hidrógeno del áció ascórbico. Sin embargo este puente libre parece ser susceptible de car bios con la temperatura y el pH debido a agitación molecular.

La Tabla VIII muestra la rata de destrucción del ácido ascórbien una solución acuosa a 3 temperaturas. La rata de destrucción a p 6,5 es 6 veces mayor a 55°C que a la temperatura ambiente. Con otrvalores de pH la rata de destrucción varía de 1-4 veces, dependient del pH. Así se da una idea de la predicción de la estabilidad a temperaturas más bajas por estudios de estabilidad a temperaturas mayore

Examinando los resultados obtenidos con los estudios de la est bilidad del ácido ascórbico en solución acuosa, en comparación con otr vehículos no acuosos, puede deducirse que el grado de contenido hídri influye notablemente en la velocidad de degradación del ácido ascó bico, la cual será mayor en un jugo de guayaba con un contenido hídri de aproximadamente 88% que en una pasta de tomate con un contenio hídrico aproximadamente de 58%.

El volumen de la parte libre, por encima del líquido o del produc enlatado, influye de manera más o menos notable en la estabilidad d ácido ascórbico en los enlatados y puede decirse que ésta disminuye aumentar la columna de aire en la parte superior del envase. Este fact se controla cuando se examina el peso del enlatado y el volumen ellenado. Generalmente se deja una columna libre que corresponde m o menos al 5% del volumen total del recipiente (un cilindro de 2,5 c: de radio por 0,5 cm. de altura en el caso de envases con capacidad 6 onzas).

Una columna muy grande puede ocasionar problemas en la este: lización y podría por vía indirecta ser causa de desarrollo de micr organismos y de fermentaciones con aparición de abombamientos y cambios en el color, sabor, olor, etc.

TABLA VIII

RETENCION DE ACIDO ASCORBICO DE ACUERDO CON EL TIEMPO, EL pH, LOS VEHICULOS, A DIFERENTES TEMPERATURAS, EXPRESADA EN %

TEMPERATURA AMBIENTE

			D 1	AS		
pН	4	10	20	30	40	50
2,5	97,0	93,4	80,0	67,4	57,8	48,5
3,5	99,79	96,5	87,9	75,1	65,9	54,8
4,5	94,93	91,2	71,2	64,1	50,0	44,5
5,5	94,9	86,4	71,2	61,7	41,2	23,6
6,5	92,11	88,5	75,5	67,5	51,9	36,
2,5	49,79	94,6	78,0	73,0	58,6	51,5
3,5	94,93	91,2	83,2	73,2	65,2	54,8
4,5	92,30	96,3	78,5	69,0	45,9	44,
5,5	100,0	110,0	85,2	75,1	58,9	51,
6,5	87,51	96,05	73,0	68,2	47,0	40,8
	2,5 3,5 4,5 5,5 6,5 2,5 3,5 4,5 5,5	2,5 97,0 3,5 99,79 4,5 94,93 5,5 94,9 6,5 92,11 2,5 49,79 3,5 94,93 4,5 92,30 5,5 100,0	2,5 97,0 93,4 3,5 99,79 96,5 4,5 94,93 91,2 5,5 94,9 86,4 6,5 92,11 88,5 2,5 49,79 94,6 3,5 94,93 91,2 4,5 92,30 96,3 5,5 100,0 110,0	pH 4 10 20 2,5 97,0 93,4 80,0 3,5 99,79 96,5 87,9 4,5 94,93 91,2 71,2 5,5 94,9 86,4 71,2 6,5 92,11 88,5 75,5 2,5 49,79 94,6 78,0 3,5 94,93 91,2 83,2 4,5 92,30 96,3 78,5 5,5 100,0 110,0 85,2	2,5 97,0 93,4 80,0 67,4 3,5 99,79 96,5 87,9 75,1 4,5 94,93 91,2 71,2 64,1 5,5 94,9 86,4 71,2 61,7 6,5 92,11 88,5 75,5 67,5 2,5 49,79 94,6 78,0 73,0 3,5 94,93 91,2 83,2 73,2 4,5 92,30 96,3 78,5 69,0 5,5 100,0 110,0 85,2 75,1	pH 4 10 20 30 40 2,5 97,0 93,4 80,0 67,4 57,8 3,5 99,79 96,5 87,9 75,1 65,9 4,5 94,93 91,2 71,2 64,1 50,0 5,5 94,9 86,4 71,2 61,7 41,2 6,5 92,11 88,5 75,5 67,5 51,9 2,5 49,79 94,6 78,0 73,0 58,6 3,5 94,93 91,2 83,2 73,2 65,2 4,5 92,30 96,3 78,5 69,0 45,9 5,5 100,0 110,0 85,2 75,1 58,9

TEMPERATURA 37°C

Vehíc ulo	pН	4	10	20	30	40	50
Agua destilada .	2,5	97,6	80,4	57,4	37,4	14,4	444
	3,5	99,8	88,5	65,7	50,2	35,2	
	4,5	92,3	78,9	61,7	42,7	24,2	***
	5,5	81,87	81,3	61,7	45,1	25,3	
	6,5	94,79	80,9	68,2	53,9	25,9	
Soluc ión salina fi-	2,5	97,51	91,07	73,0	53,5	37,5	
siológica	3,5	89,87	88,8	76,1	61,7	43,3	
	4,5	87,45	81,3	71,7	69,0	25,0	
	5,5	92,1	85,8	65,7	48,7	19,9	
	6,5	94,6	88,5	68,2	53,5	33,3	
Agu a destilada con	2,5		82,2	62,4	45, 2	22,8	
sulfato de dihidro-	3,5	***	91,2	73,2	55,8	39,3	
estreptomicina	4,5		79,8	63,7	48,2	31,7	
(0,33 mg. x cc.).	5,5	3.4	99,7	77,0	62,5	37,0	
	6,5		80,4	51,6	36,6	12,4	7772

TABLA VIII

RETENCION DE ACIDO ASCORBICO DE ACUERDO CON EL TIEMPO, EL LOS VEHICULOS, A DIFERENTES TEMPERATURAS, EXPRESADA EN

TEMPER	ATTTRA	55°C

Vehículo	pН	4	10	20	30	40
Agua destilada .	2,5	85,1	54,2	30,0	4,9	Nada
•	3,5	86,0	58,1	17,0	2,3	Nada
	4,5	80,9	44,3	9,5	1,1	Nada
	5,5	93,6	78,9	52,2	30,7	Nada
	6,5	77,8	32,7	Nada	Nada	Nada
Solución salina fi-	2,5	85,5	65,7	36,5	17,0	Nada
siológica	3,5	86,0	62,1	23,6	4,6	Nada
	4,5	83,9	62,1	23,6	23,0	Nada
	5,5	83,0	68,2	39,0	24,2	Nada
	6,5	90,7	78,4	51,2	29,2	Nada
Agua destilada con	2,5		71,4	30,7	17,2	
sulfato de dihidro-	3,5		73,6	47,2	25,8	
estreptomicina	4,5		61,5	7,8	2,1	
	5,5		79,9	36,0	11,1	
	6,5		87,1	68,9	38,6	

Fenómeno de corrosión.

Otro factor que puede determinar la inactivación o destrucción ácido ascórbico en un enlatado es la corrosión que se origine en el la de envase. Como se sabe el ácido ascórbico es destruído por los meta pesados, especialmente por el cobre. Esta corrosión depende de la na raleza del producto enlatado, del pH, del contenido hídrico, del mayo menor contenido de ataque del metal, de la misma calidad de la mate prima empleada en la fabricación del envase, de la clase de substance empleadas para recubrir el interior de la lata, de la uniformidad de película, de la parte libre por encima de la superficie del líquido o producto, del grado de vacío y aun de la clase de preservativos presen en el producto.

Los estudios hechos para determinar el deterioro del ácido ascórb en enlatados, mantenidos a diferentes temperaturas, y por un tiem hasta de 30 días, dejaron apreciar diferentes grados de corrosión en diferentes enlatados, y en los diferentes productos. En general, pue decirse que parece haber una relación directa entre la temperatura

almacenamiento y el grado de ataque, presentándose el mayor grado a temperatura más alta. El grado de ataque está relacionado también en forma directa con el tiempo de almacenamiento, y se observó que la corrosión o ataque es de grado más variado y más profunda en el caso de enlatados de varios meses de envasados.

Las formas de ataque más corrientemente presentes en los enlatados sometidos a estudio fueron las de escamas, diseminadas unas veces en toda la extensión de la pared en contacto con el producto, otras veces más abundantes en la parte superior, y más corrientemente muy notorias y abundantes a lado y lado de la unión lateral de cierre de la lata. Otra forma de ataque visible en forma de rayas circulares y longitudinales, de diferente amplitud, localizadas de preferencia a lado y lado del cierre lateral de la lata y en la parte superior y más notorias en la parte superior de la misma.

Otra forma de ataque se manifestó por escaras mucho más grandes que las escamas, de forma bastante redondeada en la generalidad de los casos, muy notorias y en contraste con el color y el aspecto del resto de la superficie. Esta clase de ataque se observó especialmente en la pasta de tomate.

En algunos casos se observó la presencia de líneas más o menos anchas, más oscuras que las ya mencionadas, circulares y presentes en la parte superior de la lata y a veces en la parte inferior a manera de línea de nivel.

En general se observó un contenido menor de ácido ascórbico en en los productos cuyos envases exhibían mayor grado de ataque o corrosión.

INFLUENCIA DEL METODO DE FABRICACION O PROCESAMIENTO DEL MATERIAL SOBRE LA RETENCION O INACTIVACION DEL ACIDO ASCORBICO

Otro factor que influye de manera preponderante sobre la estabilidad, retención o inactivación del ácido ascórbico presente en la materia prima, ya sea de origen vegetal o animal, es el método de fabricación o el tratamiento que se sigue en la elaboración de una conserva o de un producto comestible.

En el método en sí inciden de manera directa: la forma de desarrollo de la tecnología del proceso, la clase de material de los recipientes de cocción y de todos los instrumentos y aparatos usados en operaciones previas a la cocción, la fuente de calor: llama directa, vapor de agua a presión, quemadores de gas, etc., el tiempo de cocción y el método de cocción: ebullición simple, cocción a presión, cocción electrónica, etc., y de la cantidad de agua que se utilice en la cocción.

Los recipientes destinados a contener el producto durante la cocció son generalmente de forma cilíndrica, con doble fondo redondeado, cuna entrada y una salida para el vapor de agua a presión, construíd generalmente de materiales resistentes a la acción del calor o de los marriales destinados a la cocción. Requieren un cuidado especial en cuanto su limpieza y mantenimiento.

La fuente de calor en casi la generalidad de los casos está represe tada por vapor de agua a presión, generado por una caldera de tama: y capacidad proporcionados a las necesidades de la planta.

El tiempo de cocción depende especialmente de la naturaleza d material y de la clase de producto en elaboración.

El efecto que sobre el ácido ascórbico presente en la materia prim vegetal o animal, tiene la clase de tratamiento a que se someta dicho m terial, puede apreciarse en un estudio realizado por Miriam Higgi Thomas y Doris Howes Calloay de la Nutrition Branch, Food Divisio Quartermaster Food and Container Institute for the Armed Forces U. A., titulado "Evaluación nutricional de alimentos deshidratados y col paración con alimentos procesados por métodos térmicos y de radición" (44).

Dicho estudio analiza el efecto de cada uno de los métodos anterio mente citados sobre los nutrientes presentes en la materia prima, la c gestibilidad del producto y el estado de contaminación con elementos n crobianos en el producto terminado.

Los alimentos deshidratados proporcionan economía de espacio y opeso. Se esperó también que muchos alimentos serían mucho más estably palatables después de la deshidratación, que después del tratamien térmico y que además podrían agregarse algunos otros alimentos a l mismas raciones.

Antes de la deshidratación los alimentos se someten a un proce de blanqueo, para inactivar las enzimas, fijar el color y remover l materiales extraños y los gases. Con frecuencia se agregan sulfitos SO₂, en esta etapa del tratamiento, con el objeto de darles mayor est bilidad.

La cocción de los alimentos generalmente causa cambios químicen los constituyentes sensibles a la acción del calor. A menudo represenventajas remover la mayoría del agua durante este proceso. La preco ción conduce a un producto que no requiere un tratamiento largo ϵ el momento de consumirlo, lo que lo hace útil en casos en que se necesifacilidad y corto tiempo de preparación como para fines militares.

La deshidratación va, corrientemente, acompañada de la vaporiz ción del agua por medio del calor, y comprende el transporte del agu a la superficie del alimento y posterior remoción de ella en forma de vapor.

En deshidratadores de túnel usados para secar papas, zanahorias, repollos, habas precocidas y arroz, el producto es expuesto a la acción de una corriente de aire caliente à temperaturas comprendidas entre 140-200°F. Cuando el material que va a secarse puede convertirse en una pasta como en el caso de las "papas majadas" y el puré de tomate, puede extenderse sobre un rotor.

Los líquidos frecuentemente se dispersan en pequeñísimas gotas y escan en una corriente de aire caliente dirigida hacia arriba. Este étodo de dispersión o atomización se aplica generalmente a la leche, los mevos y el café. Algunos productos líquidos que son muy sensibles a la ceión del calor, como los jugos de frutas, pueden secarse satisfactoriante al vacío a temperaturas más bajas, puesto que al disminuír la resión se disminuye el punto de ebullición del agua.

La disminución de la presión hasta cerca de 1mm/Hg. permite la ceshidratación en el estado de congelación, donde el agua pasa libremente del estado líquido. Este procedimiento de congelación-secado, llamado liofilización, produce cambios más pequeños en las características físicas del producto y su uso se ha incrementado bastante para el tratamiento de productos que presentan problema en la deshidratación como las carnes y algunos vegetales.

Una revisión rápida de las técnicas comprendidas en el proceso de la deshidratación deja ver algunos pasos en los cuales podría anticiparse la pérdida de nutrientes. Puede ocurrir una extracción de los productos solubles en agua, durante el lavado y algunos procedimientos de blanqueo. El tratamiento con calor resulta perjudicial, la mayoría de las vitaminas, proteínas y ácidos grasos esenciales sufren descomposición, que puede acelerarse con la presencia de aire y de luz. La estabilidad de los nutrientes está influenciada además por la alcalinidad o acidez del producto, por la presencia de enzimas activas y la presencia de productos adicionados tales como los sulfitos.

Sin embargo, algunos de estos agentes potencialmente perjudiciales se encuentran presentes en alimentos deshidratados y en alimentos enlatados y los resultados se compararon con el fin de determinar si los métodos de procesamiento eran competitivos. Para éstos se escogieron muestras al azar y los datos de los análisis se compararon con datos previamente acumulados o con valores publicados por los productores. Esos datos pueden verse en las Tablas IX y X. Entre las frutas y vegetales las diferencias, en el contenido de vitamina C no fueron muy grandes. Sin embargo, en los productos que contribuyen con cantidades esenciales de esa vitamina, dicha diferencia, cuando existió, favoreció a los productos deshidratados.

Pueden hacerse comparaciones válidas solo cuando todas las mues tras se toman de la misma materia prima. Se hizo un estudio adiciona para ver cuál de los tres métodos de procesamiento resultaba mejo cuando se aplicaba a porciones de un mismo lote de producto.

Se seleccionaron 5 alimentos representativos, de origen animal ; 5 de origen vegetal: repollo, zanahoria, maíz y habas verdes. Solo s consideran los de origen vegetal, para los fines del presente trabajo.

En los productos mencionados se determinó el contenido de nutrien tes antes y después de cada proceso: deshidratación, irradiación y e proceso térmico usual. En la mayoría de los casos las muestras fueror deshidratadas antes y después de la cocción. Las muestras irradiada fueron tratadas para inactivar las enzimas o fueron cocidas completa mente antes de la irradiación. Solo el repollo no fue procesado térmica mente. La materia prima, en el caso de las habas verdes y el maíz, fue en su mayoría un producto comercial. Luego se sometieron las muestras a cocción por un método apropiado; según el producto, se analizó otra ver el contenido vitamínico. Se hizo análisis de ácido ascórbico reducido pácido ascórbico total.

TABLA IX

HUMEDAD Y CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO EN LOS VEGETALES
PROCESADOS. EXPRESADO EN MG. X 100 GM.

	Despué	s de proces Acido as		Preparado para el consum Acido ascórbio				
Producto	Humedad %	Reducido	Total	Humedad %	Reducido	Tota		
Habas verdes:								
Inicial, congelado	92.5	3	4					
Deshidratado, inicial	3.3	6	16	88.6	0	2		
Deshidratado, precocido	3.4	10	15	90.4	0	1		
Irradiado, enzim., inact.	89.8	0	4	88.4	0	2		
Irradiado, precocido	89.6	0	4	88.5	0	2		
Enlatado	93.2	0	1	91.5	0	1		
Repollo:								
Materia bruta	91.8	38	42					
Deshidratado	1.2	45 0	457	88.0*	26	29		
Deshidratado, precocido	2.4	361	378	86.9	27	25		
Irradiado, enzim., inact.	92.1	0	28	91.9*	0	2		
Irradiado, precocido	92.4	0	23	92.2	0	10		

	Despué	de procesa Acido aso		Preparado para el consumo Acido ascórbico				
Producto	Humedad %	Reducido	Total	Humedad %	Reducido	Total		
Zanahorias:								
bruta	87.2	6	6					
Deshidratado	3.5	29	32	85.5	1	2		
Deshidratado, precocido	4.0	26	36	85.5	1	2		
Irradiado, enzim., inact.	86.3	0	5	86.4	1	3		
Irradiado, precocido	86.6	0	5	86.7	0	4		
Enlatado	90.8	1	2	89.3	0	1		
Maiz:								
Inicial, congelado	68.3	9	9					
Deshidratado	5.2	12	18	70.8	2	6		
Deshidratado, precocido	3.8	13	16	70.2	2	3		
Irradiado, enzim., inact.	70.2	3	6	72.2	3	5		
Irradiado, precocido	69.7	6	6	72.2	3	5		
Enlatado	76.2	3	4	73.6	2	3		

[·] Para ser servidos en bruto, todos los demás son calentados.

De los 4 vegetales estudiados, solamente el repollo contenía una gran cantidad de ácido ascórbico. Después de la irradiación no se encontró ácido ascórbico reducido, la mayoría del contenido inicial se convirtió en la forma oxidada, lo que se refleja en el contenido total de 23-28 mg. x 100 Gm. de ese producto. La mayoría de ácido dehidroascórbico se destruyó después de la preparación de las muestras irradiadas para el consumo. El ácido ascórbico presente en el repollo se retuvo bastante bien en los productos deshidratados.

El efecto que el método de cocción electrónica tiene sobre el valor nutritivo de los elementos y en particular sobre el ácido ascórbico puede apreciarse en un estudio desarrollado por Miriam Higgins Thomas, Sadie Brenner, Adalene Eaton y Virginia Craig (45).

Este método también conocido como calentamiento electrónico, dieléctrico o de alta frecuencia, ha ocupado un importante puesto dentro de las posibles aplicaciones del calentamiento electrónico. Moyer y colaboradores (46) y Proctor y colaboradores (47) han reportado notables ahorros de nutrientes cuando se ha empleado este método para blanqueado. Esto hizo pensar que su empleo podría significar ahorros de nutrientes o sea que este método podría resultar menos perjudicial para los nutrientes si se le empleaba en la cocción. El equipo de investigadores anteriormente citado determinó la retención de nutrientes en carnes y vegetales de uso común en la alimer tación como son: repollo, zanahoria, brécol, papa, tortas de carne de rey de cerdo, y carne de res asada.

Esos alimentos fueron cocidos utilizando el calor electrónico en ϵ intervalo electrónico descrito por Proctor.

Simultáneamente se prepararon muestras similares, empleando le métodos convencionales tales como ebullición simple, cocción a presión por horneo. Debido a la limitada capacidad del equipo electrónico utilizado, solo pudieron probar o examinar los efectos de la preparación e pequeña escala. Los detalles del procedimiento utilizado pueden encor trarse en la literatura (48).

Preparación de las muestras para el estudio.

Para efectos del presente trabajo solo se presentan los métodos d preparación y los resultados obtenidos con vegetales.

Repollos. Se utilizaron repollos mondados de peso aproximadament igual. Se dividieron en 4 partes y se removió el exceso de corazón utilizando luego partes representativas para tratamiento por los diferente métodos. Cada lote de muestra pesaba aproximadamente de 350-400 Gm (peso promedio: 352 Gm.). Se determinó la cantidad de vitamina presente en el agua y en los sólidos. Se hicieron de 9-12 preparaciones po método de procesamiento.

Zanahorias. Se seleccionaron zanahorias de peso aproximadament igual, se pelaron y partieron en pedazos. De cada zanahoria se tom una parte para tratarla por cada uno de los métodos mencionados. S tomaron muestras de 225 Gm. de peso promedio (220-260). Se examinó l presencia de vitaminas hidrosolubles en los sólidos y en el agua de cocciór

Brécol. Debido a los diferentes tiempos de cocción de las inflores cencias y de los tallos, los experimentos se hicieron con inflorescencia provistos de tallos de aproximadamente 2 pulgadas. Se distribuyero inflorescencias del mismo tallo en las diferentes muestras. El peso d la muestra osciló entre 290-320 Gm. con peso promedio de 300 Gm. S hicieron análisis de vitaminas en la porción líquida así como en la sólida.

Papas. Se axaminó la retención de nutrientes en papas cocidas ; en papas tostadas. Para las papas cocidas se usó la variedad McClure Las papas, con peso aproximado de 60-75 Gm., se pelaron y partieror en 4 pedazos, y se tomó una parte para cada muestra. La muestra co cida total pesaba aproximadamente 380 Gm. Se hizo análisis de ácido ascórbico en las porciones sólida y líquida.

Para las papas tostadas se emplearon papas Idaho sin pelar, con un peso aproximado de 187 Gm., las cuales se hornearon individualmente durante 2 minutos, por calentamiento electrónico hasta alcanzar una temperatura interna comprendida entre 185-210°F. De estas papas 5 de ellas se combinaron para hacer los análisis. Se hicieron 3 análisis para ácido ascórbico. Se estudió el efecto del incremento del número de papas que se cocieron simultáneamente. Con este fin se sometieron a cocción 6 papas durante 8 minutos.

Se hornearon también papas con corteza empleando el horno eléctrico.

Método de análisis. Se tomaron muestras de 200 Gm., representativos de los diferentes alimentos y se mezclaron con un peso igual de una solución estabilizadora utilizando para esto un homogenizador tipo Osterizer. Para el ácido ascórbico se utilizó una solución de ácido metafosfórico al 10%. Se utilizaron los métodos del 2,6 diclorofenolindofenol tal como lo describen Loefler y Ponting (49). El ácido ascórbico total se valoró por el método de Roe utilizando 2,4 dinitrofenilhidrazina (50). La cantidad de vitamina presente en una muestra y la retención de la misma se calculó sobre la base del peso del lote (51).

RESULTADOS

Los resultados de los análisis hechos pueden verse en la Tabla X. Acido ascórbico total. Como puede verse, en ningún caso el método de cocción electrónica resultó apreciablemente mejor que el método de ebullición o el método de cocción a presión, para retener el ácido ascórbico en vegetales.

El brécol, cuando se trató electrónicamente, retuvo el 64% del ácido ascórbico original, mientras que con el método de cocción bajo presión se retuvo el 72% y con la ebullición simple se retuvo el 60% de ácido ascórbico originalmente presente en la muestra.

En los repollos sometidos a cocción bajo presión, al calentamiento electrónico, al método de ebullición simple se retuvo el 83, 80 y 77%, respectivamente. La retención de ácido ascórbico en las papas hervidas fue mayor que en las papas horneadas. En las papas cocidas a presión, por el método electrónico y en cacerola, se retuvo el 86, 81 y 76% de ácido ascórbico, respectivamente. En las papas tratadas electrónicamente una por una o simultáneamente, se retuvo solo el 52% y cuando se hornearon, se retuvo el 47% del ácido ascórbico.

Como puede verse en la Tabla X, con el agua de cocción se extrajo una cantidad apreciable de ácido ascórbico, cuando las muestras se sometieron al tratamiento por el método electrónico y el método de ebullición simple.

				Reten	nción de	ácido a	ascórbi	c o	
Método de cocción	Cantidad de agua de cocción Gm.	Tiempo de cocción Minutos	Límites %	Sólidos Promedio %	Desviación %	Límites %	fquido Promedio %	s Desviación %	Prom. Ac. Asc. Reten. en sólido %
$Br\'ecol$:									
Electrónico Ebullición simple . Cocción a presión .	450 450 70	5½ 7 576	54-71 48-72 61-79	64 60 72	5,6 7,0 6,9	16-30 20-29 4-7	23 25 6	4,6 3,2 1,02	66 61 73
Repollo:									
Electrónico Ebullición simple . Cocción a presión .	690 690 70	6 15 1¼	47-67 35-52 61-77	59 42 71	7,9 5,8 6,1	22-36 29-45 6-17	31 37 10	7,6 6,5 6,0	57 39 63
Zanahorias:									
Electrónico Ebullición simple . Cocción a presión .	110 130 70	21/4 9 1	73-90 70-89 70-87	83 80 77	6,7 6,0 6,9	11-18 8-15 10-16	15 10 13	2,1 2,2 2,1	81 73 67
Papas:									
Herbidas Electrónico Cocción a presión .	450 450 100	$\begin{matrix} 6\\18\\9\end{matrix}$	61-111 53-93 69-105	81 76 86	15,0 11,8 12,2	$9-15 \\ 16-22 \\ 3-8$	13 18 5	2,1 2,3 1,4	93 88 91
Electrónico. Sola	2 8 39		42-70 47-68 40-54	50 53 47	10,1 8,4 4,6				

En el caso del brécol se encontró el 25% en el agua, para las espinacas 22-33%. Sin embargo, para las papas y las zanahorias la cantidad de ácido ascórbico en el líquido no fue muy diferente para los métodos de cocción. La retención en el agua osciló entre 10-15% para las zanahorias y entre el 5-18% para las papas.

La cantidad de agua utilizada en el tratamiento, así como la duración del mismo, son factores que afectan la retención de ácido ascórbico y de nutrientes en los vegetales.

En general las pérdidas mayores de nutrientes hidrosolubles se presentaron cuando se utilizó el método de ebullición simple y el método electrónico, debido a que en estos métodos se utilizaron cantidades mayores de agua, en comparación con el método de cocción bajo presión. La disminución del tiempo de cocción utilizado en el método de cocción a alta frecuencia, también mostró tendencia a incrementar la retención de ácido ascórbico y en general de nutrientes, en vegetales. Sin embargo, el efecto de la disminución del tiempo de cocción sobre la retención de ácido ascórbico y nutrientes no fue tan marcado como el del agua de cocción.

La disminución que se presentó en el contenido de ácido ascórbico después de la cocción se debió a un efecto combinado de disolución y destrucción. La pérdida por destrucción no fue lo suficientemente compensada con la formación de ácido dehidroascórbico como se demuestra en la Tabla X. Los valores correspondientes a ácido ascórbico reducido y ácido ascórbico total fueron similares, lo que indica que el ácido ascórbico que se perdió por cocción no se recuperó como ácido dehidroascórbico sino que se oxidó hasta una forma más avanzada.

EL ACIDO ASCORBICO EN EL BOCADILLO DE GUAYABA

El bocadillo hecho con guayaba se conoce y consume en casi todas partes del territorio nacional y hoy ya se conoce en muchos países de Europa y América y en algunos de ellos se consume aunque en pequeñas cantidades. En años anteriores fue renglón de exportación.

En Colombia la manufactura de bocadillo representa una buena fuente de trabajo en muchas regiones, y en algunas de ellas es un renglón preponderante en la economía y aun en la alimentación. Las principales regiones productoras de bocadillos son entre otras: Vélez, Moniquirá, Barbosa, San Gil, Bucaramanga, Puente Nacional, Bogotá, D. E. En muchas de estas regiones la producción se hace en forma rudi mentaria, no industrializada, y como industria casera. Existen tambié: fábricas de bocadillo con instalaciones mayores y cuyas produccione en años anteriores han llegado a exportarse en gran parte, especialment a los Estados Unidos de Norteamérica.

Proceso general de fabricación.

El proceso de fabricación del bocadillo aunque varíe en cuanto la técnica, los utensilios, recipientes para la cocción, homogenización d la fruta, molde y secado, etc., se basa sobre el mismo principio: conversión de la fruta cernida adicionada de azúcar hasta jalea, por caler tamiento.

En algunas regiones la cocción se hace a fuego directo y la agitació se efectúa con palas de madera que se accionan manualmente.

En la mayoría de los casos dicha cocción se hace en recipientes d fondo redondo o "fondos" de cobre. En las fábricas industrializadas l cocción se hace por calentamiento con vapor de agua a presión en fondo de cobre de doble fondo, con una entrada y una salida para el vapor provistas además de un agitador mecánico compuesto por 2 paletas d madera colocadas en cruz y que giran a una velocidad constante.

La guayaba que viene del mercado o directamente del cultivado se selecciona de acuerdo a su grado de madurez diferenciando la madura y la verde o "pintona". La selección se hace en artesas llenas o agua y al mismo tiempo se lava la fruta. La guayaba madura pasa a máquina cernidora, donde se separa la pepa de la pulpa y además h mogeniza la pulpa.

Esta máquina cernidora está compuesta por un alimentador ϵ forma de caja, fabricado generalmente de latón. Este alimentador, in clinado, deja caer la fruta sobre una formación de cilindros metálico concéntricos, con la superficie provista de agujeros pronunciados a m nera de rallo y conectados por una correa a un motor. Están provisto de un orificio en la parte inferior para la salida de la masa y uno ϵ la parte lateral para la salida de las pepas.

La guayaba verde o "pintona" se somete a cocción en recipientes cobre de doble fondo, con calentamiento de vapor de agua a presió generado por una caldera. Se adiciona agua para facilitar la cocció en cantidad necesaria para cubrir ligeramente la fruta. El tiempo cocción es de aproximadamente una hora. Luego la fruta cocida se llera la cernidora.

Después del cernido, la masa se lleva a los fondos de cobre o fondo plano provistos de agitadores mecánicos de paletas de madera se deja en cocción por un tiempo aproximado de 30-60 minutos.

Al empezar la cocción se adicionan unos 25 kg. de azúcar a cada fondo de 10 kg. de masa. Al final del proceso de cocción se adicionan ácido cítrico en proporción de 15 gm. una cucharada, por cada 10 kg. de masa y unos 2 gm. de colorante por cada 10 kg. de masa. El ácido cítrico ayuda a mejorar el sabor, permite una mejor y más rápida gelificación de la masa y además previene el "sudado". Este fenómeno se caracteriza por la aparición de gotas de agua en la superficie del bocadillo o en el papel celofán de empaque. Se presenta especialmente en los climas cálidos y durante su almacenamiento y transporte en las bodegas de los barcos por un tiempo más o menos prolongado. Esto ocasiona deterioro de la calidad por cambios en la consistencia, aspecto y resistencia necesarios para el transporte. El colorante se adiciona con el fin de homogenizar y acentuar el color de la masa, así como para obtener capas de diferentes colores: blanco y rojo, para la confección de bocadillo de dos colores; una blanca externa y una interna de color rojo. El colorante más comúnmente usado y puede decirse que casi en forma exclusiva, es el "Rojo Bayer". Después de la cocción la jalea se extiende en moldes de madera, de aproximadamente 30 cms. de ancho por 5 de profundidad y dos metros de largo, cubiertos con una tira plástica que facilita el ulterior desprendimiento o separación del material ya seco y endurecido.

Se coloca primero una capa de jalea blanca, sin colorante, que se deja secar por aproximadamente 30 minutos. Luego se coloca una capa de jalea coloreada que se deja secar por un tiempo aproxidamente igual para colocar sobre ésta una nueva capa de jalea blanca que también se deja secar.

Cuando la masa se ha endurecido se lleva a las cortadoras y se corta en pedazos del tamaño deseado que luego se envuelven. El cortado puede hacerse también manualmente. Cuando la producción se hace en pequeña escala, la jalea se extiende en mesas húmedas y se deja secar al aire libre, cortando luego las piezas con un cuchillo metálico o con una paleta de madera afilada.

Para envolver se utilizan "hojas de bijao" (Calathea Altissima) secas y hoy se está imponiendo el uso del papel celofán para envolver.

La "hoja de bijao" presenta sus inconvenientes porque además de no proteger de manera eficiente contra la humedad, puede ser causa de descuido en la higiene y limpieza en la elaboración del producto ya que estas hojas se secan al sol sobre el prado, generalmente en potreros que mantienen ganados y que en la mayoría de los casos sirven también de letrinas al aire libre a los campesinos y labriegos. El celofán elimina estos inconvenientes y además disminuye el espacio necesario para su almacenamiento por disminución del volumen. Es de fácil consecución

en el mercado y aunque su precio es mayor se justifica si se compara con las ventajas que ofrece.

El empaque se hace en cajas de madera y más modernamente en cajas de cartón que presentan ventajas mayores ya que pesan menos, tienen más facilidades para su consecución, requieren menos espacio para su almacenamiento, protegen más el producto y además cada productor puede idear sus propios modelos de cajas, permite la rotulación y propaganda en el empaque, ofreciendo así una mejor presentación del producto, factor éste muy importante en el mercado de competencia puesto que también representa calidad. El producto puede presentarse en forma de bloques o en bocadillos empacados por separado, en cajas de diferente capacidad.

El bocadillo de guayaba como fuente de ácido ascórbico.

Examinando el proceso de fabricación del bocadillo y los diferentes tratamientos a que se somete y teniendo en cuenta los factores de estabilidad del ácido ascórbico, se consideró importante hacer un estudio de la destrucción de la vitamina a través de todo el proceso. Con este objeto se visitaron diferentes fábricas de bocadillos, se examinaron las diferentes etapas del proceso, se tomaron muestras de materia prima en diferentes etapas de transformación y se analizó en ellas el contenido de ácido ascórbico utilizando el método de titulación visual con 2,6 diclorofenolindofenol.

Las muestras se tomaron con una cuchara de aluminio y se envasaron en frascos de vidrio con tapa metálica, llenando siempre el frasco hasta casi el total de su volumen para evitar la influencia del oxígeno del aire. Las muestras se mantuvieron en una nevera antes de someterlas al análisis que empezó a hacerse tan rápidamente con el objeto de evitar pérdidas en el contenido de vitaminas, por almacenamiento prolongado del producto. Se tomaron muestras de guayaba sin cocer, verde y madura, guayaba cocida, guayaba cernida y masa con diferentes tiempos de cocción así como del producto terminado.

Para efectos del análisis las frutas se dividieron en porciones utilizando una espátula de acero inoxidable y luego se hizo la homogenización y extracción con la solución estabilizadora empleando para esto un hemogenizador tipo Osterizer. Se hicieron varias titulaciones y se sacó un valor promedio de ellas.

El análisis de frutas y su contenido en ácido ascórbico expresado en mg. x 100 gm. de fruta, así como la diferencia de contenido según el grado de madurez, puede resumirse en la siguiente Tabla:

TABLA XI

	Peso promedio	Acido as	córbico	Diferencia
Producto	Gm.	mg. x 100 Gm.	mg. x fruta	mg. x 100 Gm.
Guayaba madura	59,5	91,6	54, 5	
Guayaba verde	62,9	80,2	50,45	11,4

Como puede apreciarse en la Tabla anterior el grado de madurez influye notablemente en el contenido de ácido ascórbico, pues las guayabas maduras, a pesar de estar en estado avanzado de madurez y tener magulladuras, presentan 11,4 mg. x 100 Gm. de diferencia a su favor.

Los resultados de los análisis hechos sobre muestras tomadas en los diferentes pasos del proceso incluyendo materia prima sin cocer, guayaba cocida, cernida, jalea blanca, jalea roja, y producto terminado, pueden apreciarse en la siguiente Tabla:

TABLA XII

	Acido ascórbico		Pérdidas
Producto	mg. x 100 Gm.	Diferencia	mg. x 100 Gm.
Guayaba sin cocer	121,4		
	•	22,8	22,8
Guayaba cocida	98,6		
		2,4	25,2
Guayaba cernida	96,2		
Guayaba después de 20 minutos de		50,7	75,9
cocción. Masa roja	45,5		
Guayaba después de 20 minutos de		17,7	58,2
cocción. Masa blanca	63,2		
		5,5	81,4
Producto terminado	40		

Como puede apreciarse en la Tabla anterior el ácido ascórbico sufrió una destrucción del 81,4% desde la fruta hasta obtener el producto terminado. La pérdida que tiene lugar en la cocción de la fruta representa un 28% de la pérdida total y la pérdida que tiene lugar cuando se calienta la guayaba cernida hasta obtener la jalea representa 62,3% de la pérdida total. De aquí puede deducirse que el efecto del calor, de la presencia de sales minerales y de metales pesados, especialmente el cobre de los "fondos" de cocción y los que puedan estar presentes en el agua utilizada en la cocción son los factores determinantes de la gran mayoría de la pérdida, destrucción o inactivación del ácido ascórbico

presente inicialmente en la fruta. La pérdida de ácido ascórbico que tiene lugar en el proceso de cernido puede deberse a una oxidación de la vitamina por efecto de la ácido ascórbico-oxidasa que no haya sido destruída en el calentamiento y en mayor grado por aumento del contacto de la masa con el oxígeno del aire. Como puede apreciarse en la Tabla anterior, la pérdida en este paso no es significativa.

A pesar de que la guayaba cernida en cocción procedía de la misma fuente que la roja, se presentó una diferencia en el contenido de vitamina C del 17,7%. Esto podría indicar que el colorante tiene efecto destructivo sobre la vitamina. Sin embargo, no puede decirse que categóricamente esta sea la causa de dicha diferencia.

Como puede apreciarse al examinar el contenido de ácido ascórbico en la fruta, la materia prima es, en este caso, de baja calidad.

Teniendo en cuenta las dosis de vitamina C, como requerimiento diario para un adulto normal, establecida por la Food Drug and Cos metic Act, a saber: 75 mg. dosis ésta recomendada también por la U.S. P Federal Research Council, que recomienda además una dosis de 50 mg diarios para niños de 4 a 6 años, puede deducirse que el bocadillo de guayaba puede ser una buena fuente de vitamina C para niños y una fuente regularmente buena para adultos.

Debe considerarse también que cuando la fruta fresca o materia prima es mejor que la tomada para el presente estudio, el producto fina contendrá mayor cantidad de ácido ascórbico que la expresada en la Tabla anterior y que en dicho caso el bocadillo será una buena fuente de vitamina C para niños y adultos, más que por el contenido de dicho factor esencial, por la aceptación que tiene en la alimentación, la esta bilidad de la vitamina con el almacenamiento y también por el precio

CONCLUSIONES

Del presente estudio pueden derivarse las siguientes conclusiones

- Para análisis de ácido ascórbico en vegetales frescos y conservas que no hayan sido sometidos a almacenamiento prolongado resulta satisfactorio el uso del 2,6 diclorofenolindofenol como solución titulante.
- 2. Resultan igualmente satisfactorios los métodos de titulación visual y colorimetría cinética con 2,6 diclorofenolindofenol aunque el primero de ellos es más sencillo y requiere menos material.

- 3. Para análisis de ácido ascórbico en productos vegetales y conservas sometidos a almacenamiento prolongado y que no comuniquen a la solución extractora una coloración pronunciada, resulta satisfactorio el método de la 2,4 dinitrofenilhidrazina.
- Para análisis de ácido ascórbico en jugos de frutas y otros materiales fuertemente coloreados resulta satisfactorio el método del cloruro mercúrico.
- 5. La cantidad de ácido ascórbico presente en un enlatado depende de muchos factores: materia prima, técnica de procesamiento, contenido hídrico, naturaleza del material, presencia de preservativos, calidad del envase, pH, tiempo y temperatura de almacenamiento, etc.
- 6. El ácido ascórbico originalmente presente en la guayaba, se destruye en su mayor parte durante el proceso de fabricación del bocadillo, como era de esperarse, según el procedimiento de fabricación.
- 7. Se impone la necesidad de elaboración de un "Código de Alimentos", ya existente en otros países y también de ejercer un control más severo de las fábricas de productos alimenticios, así como de los productos en el mercado, por parte de las autoridades del ramo.

BIBLIOGRAFIA

- Dr. Gabriel Poveda. Apartes del Informe presentado a la Asociación Nacional de Industriales. Julio de 1963.
- 2. Instituto de Investigaciones Teconológicas. "Seminario sobre Control de Calidad en la Industria de Alimentos". Conferencia de la doctora Yolanda Niño sobre "Métodos físico-químicos y microbiológicos usados para el control del proceso de fabricación de alimentos". Noviembre 16-20 de 1964. Instituto de Investigaciones Tecnológicas. "Seminario sobre Control de Calidad en la Industria de Alimentos". Conferencia del doctor Norton Young L. sobre "El Instituto de Investigaciones Tecnológicas y la Industria de Alimentos en Colombia". Noviembre 16-20 de 1964.
- 3. LILLIAN HOAGLAND MEYER. "Food Chemistry". 254, 1960.
- SHERMAN, LAMER and CAMPBELL. Journal American Chemical Society, 44, 165, 1922.
- Bessey, O. A. and King, C. G. "The distribution of Vitamin C in plant and animal tissues and it determination". J. Biol. Chem. 103, 687, 1933.
- Bessey, O. A. "A method for the determination of small quantities of ascorbic and dehidroascorbic acid in turbid and colored solutions in the presence of other reducing substances". J. Biol. Chem. 126, 771 (1938).

- HOECHBERG, M., MELNICK, D. and OSER, B. L. "Photometric determination of reduced and total ascorbic acid". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 182 (1943)
- 8. Harris, L. J., Mapson, L. W. and Wang, Y. L. "Vitamin methods. A simple potenciometric method for determining ascorbic acid, suitable for use wit colored extracts". Biochem. J. 36, 183 (1942).
- 9. Snow, G. A. and Zilva, S. A. "A critical examination of Lugg's method for the determination of l-ascorbic acid". Biochem. J. 38, 458 (1944).
- ROBINSON, W. B. and Stotz, E. "The indofenol-xylene extraction method for ascorbic acid and modifications for interfering substances". J. Biol. Chen 160, 217 (1945).
- 11. Levy, L. F. "The determination of ascorbic acid in presence of sulpht dioxide". Biochem. J. 37, 713 (1943).
- 12. Roe, J. H. and Oesterling, M. J. "The determination of dehidroascorbic acid i plant tissues by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method". J. Biol. Chem. 15: 511 (1944).
- MAPSON, L. W. "Vitamin methods, 5. a note on the determination of ascorbi acid in fruits and vegetables in the presence of SO₂". Biochem. J. 36, 19 (1942).
- VAVICH, M. G., STEEN, R. M. and GUERRA, N. B. "Nutritive value of canne foods. Determination of ascorbic acid in fresh green peas". Ind. Eng. Chen Anal. Ed. 17. 531. (1945).
- 15. GAWRON, O. and BERG, R. "Estimation of vitamin C in presence of iron salts Stepwise determination of vitamin C and ferrous iron with dichloropheno indophenol". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 16, 757 (1944).
- 16. LORENZ, A. J. and Arnol, L. J. "Standarization of 2,6 dichlorophenol-indopheno with ferrous compounds". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 10, 389, 687 (1938).
- 17. Ponting, J. D. "Extraction of ascorbic acid from plants material Relativ suitability of various acids". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15, 389 (1943).
- 18. King, C. G. "Chemical methods for determination of Vitamin C". Ind. Eng Chem. Anal. 13, 225 (1941).
- Bessey, O. A. "Vitamin C methods of assay and dietary sources". J. Am Med. Assoc. 111, 1.290 (1938).
- 20. Hochberg, M., Melnick, D. and Oser, B. L. "Photometric determination o reduced and total ascorbic acid". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15, 182 (1943)
- 20'. CALDERÓN G., EDUARDO, GAVIRIA S., ENRIQUE. "Práctica de Análisis Químico Aplicados". Facultad de Farmacia. Universidad Nacional. 276, 1958.
- 21. Research Division, American Can Co., Maywood, III, Unpublished procedure
- ROE, J. H. and OESTERLING, M. J. "The determination of dehidroascorbic acid in plant tissues by the 2,4 dinitophenylhydrazine method". J. Biol. Chem. 152, 511 (1944).
- ROE, J. H. and KUETHER. "The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4 Dinitrophenylhydrazine derivates of dehydroascorbic acid". J. Biol. Chem. 147, 399 (1943).
- MILLS, M. B., DAMRON, C. M., ROE, J. H. "Ascorbic Acid, dehydroascorbic acid and diketogulonic acid". Anal. Chem. 21, 707 (1949).

- Lee Kum-Tatt and P. C. León G. "The determination of ascorbic acid in blackew mant and other coloured fruit-juice sirups". Analyst. Vol. 89. 674, 1964.
- 26. EVERED, D. F. Analyst. 1960, 85, 515.
- 27. SCHMALL, M., PIFER, C. W. and WOLLISH, E. G. Anal. Chem. 1953, 25, 1486.
- 28. JOHANNESEN, B., Pharm. Act. Helv., 1955. 30, 22. Anal. Abstr. 1955. 2. 3504.
- 29. BERGERET, J., Ind. Aliment. Agric. 1958, 75, 299; Anal. Abstr. 1959, 6, 1120.
- 30. FOULK, C. W. and BAWDEN, A. T., J. J. Amerc. Chem. Soc. 1926, 48. 2045.
- 31. LIEBMAN, H. and AYRES, A. D., Analyst, 1945. 70. 411.
- 32. SURYANARAYANA RAO, S. V., VEEREXWARA RAO, U. and GOAPALA RAO, G. Z. Anal. Chem. 1955, 145, 88.
- 33. M. C. UPRETY and B. REVIS. "Estudio sobre la estabilidad del ácido ascórbico a elevadas temperaturas en ciertos jugos de frutas y en vehículos acuosos". J. Pharm. Sci. ed. Nº 10, 1248, 1964.
- 34. GARRET, E. R., J. Pharm. Sci. 45, 171, 1956.
- 35. LEOD, H. A., PELLETIER, O. and CAMPBELL, J. A. Pharm. J. Sci. 91, 173, 1958.
- UPRETY, M. C., SEN, R. and MOHAN RAO, V. K. J. Schi., Res India 20C. 124, 1991.
- 37. AGRAWAL, D. K. and col. Indian. J. Technology. 1. 90. 1963.
- 38. GANGULY, S. K. Indian J. Pharm. 111. 145, 1949.
- 39. SCHROETER, L. C., J. Pharm. Sci. 50. 891. 1961.
- 40. BARTILUCCI, A. and Foss, N. E. J. Pharm. Sci. 43. 159. 1954.
- 41. CH'EN, C. H. Chem. Abstr. 58, 3274. b. 1963.
- 42. BANDELIN, F. J. and TUSCHOFF, J. V., J. Pharm. Sci., 44, 241, 1955.
- 43. LANDEN, M. P. and HARRIS, R. S. Food Res, 15, 79, 1950.
- 44. Folleto facilitado muy gentilmente por Quartermaster Food and Container Institute for the Armed Forces U. S. Army, Chicago, Illinois, U. S. A. Miriam Higgins Thomas and Doris Howes Calloway. "Nutritional evaluation of Dehydrated foods and comparison with foods processed by thermal and radiation methods". Marzo de 1961.
- 45. Folleto gentilmente suministrado por Quartermaster Food and Container Institute for the Armed Forces. U. S. Army, Chicago, Illinois, U. S. A. Miriam Higgins Thomas, Sadie Brenner, Adalene Eaton y Virginia Craig. "Effect of Electronic Cooking on Nutritive Value of Foods". Journal of the American Dietetic Association. Vol. 25, No. 1. Enero de 1949.
- MOYER, J. S. and STOTZ, E. The blanching of vegetables by electronics. Food Technology 1: 252, 1947.
- 47. PROCTOR, B. E. and GOLDBLITH, S. A. "Radar energy for rapid food cooking and blanching, and its effect on the vitamin content". Food Technology. 2, 95, 1948.
- 48. Bollman, M. C., Brenner, S., Gordon, L. E. and Lambert, M. E. "Application of electronic cooking to larg-scale feeting". J. Ame. Dietet. A. 24. 1014, 1948.

- LOEFLER, H. J. and PONTING, J. D. "Ascorbic Acid: rapid determination in fresh, frozen or dehydrated fruits and vegetables". Indust. & Engin. Che. Anal. Ed. 14: 846, 1942.
- 50. Roe, J. H. and Kuether, C. A. "The determination of ascorbic acid in whol blood and urine though the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivate of dehydro-ascorbic acid". J. Biol. Chem. 147: 399, 1943.
- 51. STREIGHTOFF, F., MUNSELL, H. E., BEN-DOR, B., ORR, M. L., CAILLEAU, R., LEONARD, M. H., EZEKIEL, S. R., KORNBLUM, R. and KOCH, F. "Effect of large scale methods of preparation on the vitamin content of foods". 1 Potatoes. J. Am. Dietet. A. 22: 117. 1946.