
MÉTODOS DE VALORACIÓN DE VITAMINAS

INTRODUCCIÓN

La favorable acogida que recibió la publicación titulada, **MÉTODOS DE VALORACIÓN DE VITAMINAS EN ALIMENTOS** del año 1953, cuya edición se agotara completamente, nos llevó a proyectar esta nueva contribución sobre el tema.

Naturalmente, no fue posible sólo proceder a una nueva edición, pues el correr de los años nos indicó la necesidad de introducir todas aquellas modificaciones, que nos señaló el trabajo cotidiano de laboratorio durante todo este período.

Como en la publicación anterior, hemos estimado conveniente iniciar el trabajo con una descripción de normas actualizadas sobre Recolección de Muestras en las diferentes circunstancias que pueden presentarse.

En cuanto a los procedimientos analíticos que se indican, se trata de técnicas que se describen con todos los detalles como actualmente se aplican en los laboratorios de Química y Bioquímica de Alimentos del Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

Quince años más de labor de todos los colaboradores de este Departamento en la investigación y la enseñanza, permiten abrigar la esperanza de que también esta publicación del Departamento sea de gran interés para analistas y tecnólogos de alimentos y para los alumnos que se inician en esta disciplina.

DR. HERMANN SCHMIDT-HEBBEL
con la colaboración de:
Dra. Irma Pennacchiotti M.
Dra. Lilia Masson S.
Dra. Julia Vinagre L.
Dra. María Angélica Mella R.
Dra. Keryma Alamo A.

De la forma como **se** toma una muestra y del tratamiento posterior de la muestra extraída, depende esencialmente que los resultados de los análisis reflejen realmente la composición y las propiedades del alimento original.

Condiciones primarias son: a) el hecho que la cantidad de la muestra sea suficiente para los análisis que deben practicarse y b) que su envase y **designación** aseguren que la composición no haya variado desde su extracción hasta la iniciación de su análisis.

1. DIFERENTES CLASES DE MUESTRAS

Muestra promedio. Es aquella que permite deducir la calidad promedio de la existencia total de una mercadería. Su extracción debe hacerse de tal manera que su reducida cantidad presente una composición similar a la que resultaría, al mezclar la totalidad de la mercadería para **su** homogeneización, lo que sólo es posible raras veces.

Muestra arbitraria. Es aquella que se extrae sólo de una parte de la mercadería que no permite deducir la composición promedio del total. **Es** de utilidad para establecer si **se** cumplen las condiciones bromatológicas mínimas en cualquier porción de producto, aún cuando éste no es totalmente homogéneo.

Contra-muestra. **Es** la que **se** deja en poder del dueño de la mercadería y que debe ser extraída en la misma forma, cantidad y condiciones que la muestra. De esta manera, la contra-muestra debe ofrecer las mismas posibilidades de análisis que la muestra, para poder hacer con ella un control de los resultados.

Al considerarse como una parte de la muestra misma, sólo puede dejarse contra-muestra si la muestra extraída puede ser fraccionada sin hacer peligrar el objetivo del análisis. Por ejemplo, esto no es posible **si** la cantidad de la mercadería es demasiado pequeña o si la muestra está en un envase cerrado **al** vacío u original, cuyo fraccionamiento puede alterar el contenido. Por este motivo un segundo envase original no puede considerarse como una parte de la muestra extraída, pues puede provenir de otra serie de fabricación.

Si la toma de muestras la realiza una autoridad sanitaria, conviene distinguir entre:

- a) la muestra legal, que tiene el carácter de una prueba jurídica para la sustentación del **sumario** correspondiente. Está destinada a verificar la **calidad** sanitaria de los alimentos expendidos en el comercio y establecer si están conformes con la reglamentación pertinente.
- b) **la** muestra **informativa**, en la cual no son necesarias precauciones legales por corresponder más bien al producto de una colaboración entre la autoridad sanitaria e industria.

11. EXTRACCION DE MUESTRAS

Si se trata de una cierta cantidad de alimentos, la determinación del **número de** muestras a tomar deberá ser siempre representativa de la calidad de ellas y, por lo tanto, deberá respetarse al número prescrito al respecto, escogiendo las unidades al azar y evitando cualquier factor de selección de la muestra. Cualquiera que sea el tamaño del lote, se estima que el número de muestras no debe ser, en general, inferior a cuatro.

a) Recolección de la Muestra en el Campo

Para obtener un valor representativo más exacto de los diferentes nutrientes contenidos en un alimento vegetal, **se** procede a recolectar la muestra de las diferentes áreas de la parcela, **sin** tener predilección por determinada característica como tamaño, color, etc. Hay que tener presente el dictamen de los agricultores o atenerse a nuestro criterio, para saber si el vegetal está ya en condiciones de ser consumido como alimento. Esto no quiere decir necesariamente que la parte comestible del vegetal haya llegado a su madurez, pues las condiciones en que es usado y la forma culinaria en que se prepara son impuestas por las costumbres de la comunidad.

El "Método del Azar" se basa en dividir los campos en un número conveniente de sectores que **se** enumeran. De estos sectores se sortean 1 ó más, según la extensión del terreno. De los sectores sorteados se recogen muestras a distancias de 10, 20, 30 y 40 metros, según la extensión del terreno. Por este método **se** evita el error que puede producirse debido a la inclinación de elegir siempre los mejores ejemplares.

- b) Recolección de la Muestra en **un Puesto de Venta o de un Vendedor Ambulante**.
En este caso se selecciona la muestra de las diferentes partes del puesto de venta o del recipiente en que ésta es transportada. Generalmente un promedio de 600 gramos es suficiente para efectuar las estabilizaciones. **Se** anotan todos los datos que el vendedor pueda dar en la forma especificada a continuación.
- c) Anotación de Datos
Para este fin se hace uso de una hoja especial (ver formulario de recolección) en la cual, primeramente, **se** anota el número de la muestra en el orden sucesivo de la numeración, fecha y hora de su recolección, nombre científico y vulgar, descripción de la muestra (grado de madurez, edad de la plantación, etc.), lugar donde fue tomada (si directamente del campo, comprada en el comercio o de un vendedor ambulante). A continuación se anota la localidad (país, departamento, ciudad, pueblo), frecuencia de lluvias de la localidad (medida en mm), calidad del terreno, altitud, clase de fertilizantes usados en el cultivo, si hay irrigación o no. **Se** buscan otros datos y se anotan siempre que tengan algún interés práctico. Seguidamente, es necesario ponerse en contacto con personas que conozcan todos los usos locales del alimento; para ésto, se entrevista a jefes de cocina o amas de casa.

111. TRATAMIENTO MECANICO DE LA MUESTRA

- a) Se pesa la muestra tal como fue recogida, sin lavar ni quitar partes que por cualquiera circunstancia no **se** comen. Se anota este peso.
- b) Luego se selecciona la parte comestible; si en esta parte seleccionada entran pericarpio u hojas, se lavan perfectamente en agua corriente para quitar toda sustancia que pueda alterar los datos finales y se dejan escurrir. Una vez bien seca la muestra se hace una segunda pesada total (aprovechamiento).
- c) Haciendo uso de una pequeña tabla muy limpia y un cuchillo filudo de acero inoxidable, **se** corta en pequeños pedazos, lo más menudamente que se pueda y se mezcla con las manos limpias para lograr una buena repartición de sus partes.

IV. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA SU ESTABILIZACION Y CONSERVACION

Cuando el análisis **se** practica inmediatamente o cuando se trata de muestras secas, granos, cereales, leguminosas, pepitas, etc., no hay necesidad de estabilizar; se muelen finamente en el molino o **se** reducen a partículas en el mortero y se trabaja directamente.

En los demás casos se preparan las siguientes sub-muestras:

Sub-muestra "A", para la determinación de vitaminas. **Se** pesan 200 g del producto y 100 g de solución acuosa de ácido oxálico al 1^o/o (o de ácido sulfúrico deci-normal para la determinación de tiamina y riboflavina).

Sub-muestra "B", para la determinación de carotenos. Se pesa 100 g del producto y 100 g de la solución siguiente; 30 g de hidróxido de potasio y 320 g de alcohol completando a 1000g con agua destilada.

Sub-muestra "C", para la determinación de ácido ascórbico. **Se** pesa 200 g de la solución de ácido oxálico al 1^o/o y 50 g del producto.

Una vez pesadas muestra y solución se traslada la muestra para su debida homogeneización, en forma cuidadosa y cuantitativa al vaso de una mezcladora eléctrica (Waring Blender). **Se** le agrega una cantidad conveniente de la solución (que corresponde a la Sub-muestra) y se hace funcionar el motor de la mezcladora, agregándose poco a poco la solución restante; se deja funcionar la mezcladora hasta obtener una masa o papilla "homogénea y suave". Con el motor funcionando, se agrega enseguida 3 ml de cloroformo y **se** deja correr por espacio de 30 segundos más.

Ocurre a veces, principalmente en la Sub-muestra "A", en donde entran dos partes de alimento por una de solución ácida, que cuando dicho alimento es duro, como el nabo por ejemplo, no es posible que se efectúe la mezcla, pues la hélice del Waring-Blender gira sin efectuar ninguna mezcla; esta dificultad se puede subsanar, agregando más solución ácida, por ejemplo:

$$\frac{200 \text{ g de muestra}}{200 \text{ g de sol. ácida}} = \text{factor de dilución} = 400/200 = 2.0$$

en vez de:

$$\frac{200}{100} = \text{factor de dilución} = 300/200 = 1.5$$

- d) Se transfiere la **papilla** a un **frasco ámbar** de 300 ml **valiéndose** de una **varilla** con **goma** flexible en un extremo. **Se cierra con tapa metálica** de rosca lo mejor que **se pueda** y **se deja** por tres horas en la oscuridad. La experiencia ha **mostrado**, que después de este tiempo **es posible** ajustar **más** la tapa de rosca. **Seguidamente** se lacra la tapa y una **vez** en estas condiciones se le **pega al** frasco una etiqueta con el número de la muestra, nombre, fecha, proporciones y clase de la **papilla**. **Como** factor de seguridad se pone en la tapa con un lápiz **graso** o estilete metálico todos los datos, o **Únicamente** el número de la muestra y clase de sub-muestra, encontrándose los otros datos en la hoja que le corresponde.
- e) Se **guarda** la muestra en refrigeración.

V. MODO DE LAVAR LOS VASOS DE LA MEZCLADORA ELECTRICA (Waring-Blender)

Es necesario usar un vaso **para** la solución ácida y otro para la solución básica. **Se lavan** con agua corriente hasta quitar toda partícula de muestra posible por este medio. Con un poco menos de la cuarta parte de su contenido total de agua **corriente**, se pone una **vez** el motor a funcionar, haciéndolo por segunda vez con agua destilada. **Se seca** cuidadosamente el vaso con un paño limpio y **se conecta** de nuevo el motor para eliminar los residuos de agua que **se** hayan adherido a la hélice, se **invierte** el vaso y **se** deja secar.

FORMULARIO PARA RECOLECCION DE MUESTRAS VEGETALES (En uso en el Laboratorio **FIM** de La Habana, **Cuba**)

Muestra N°	Fecha	Hora
Nombre científico		
Nombre vulgar		
Procedencia: Provincia		Comuna:
Barrio:		Parcela:
Suelo: Preparación		
Abona:		
Altura: metros	Lluvia:mm.	Riego:
Descripción del alimento (parte de la planta, madurez, calidad, edad, plagas, etc.).		
Parte comestible: (Descripción, método de preparación, número de unidades etc.)		
Peso bruto	g	Peso neto (porción comestible):
	Submuestra	g material g líquido ml cloroformo
	A	-----
	B	-----
	C	-----
Métodos de uso como comida en la zona:		
Otros datos:		
Costo: N° de unidades:	-----	
precio c/u	-----	
pagado	-----	
Muestra despachada:	Muestra de Herbario	
fecha:	Recolectores:	
vía:	-----	
costo:	-----	
Recibida:	-----	
fecha:	-----	
estado:	-----	

DETERMINACION DE CAROTENO Y VITAMINA A^{2,3,4}

FUNDAMENTOS:

Método **espectrofotométrico**. Se basa en medir la absorción de una solución de vitamina A en alcohol isopropílico a 325 nm.

Método **colorimétrico**. Se basa en medir a 625 nm la absorción del color azul producido por la reacción entre la vitamina A y el tricloruro de antimonio, ambos en solución clorofórmica.

MATERIAL NECESARIO:

- Columnas para cromatografía de 15 cm de largo y 1,5 cm de diámetro con llave esmerilada.
- Espectrofotómetro Zeiss PMQ II.
- Lámpara de luz ultravioleta.

REACTIVOS NECESARIOS:

- Etanol puro de 95° redestilado sobre KOH (lentejas).
- Hidroquinona Merck p.a. extra pura.
- Eter de petróleo Merck p.a. PB. 40-60° C.
- Sulfato de sodio Merck p.a.
- Fenoltaleína al 1°/o en solución alcohólica.
- Carbonato de potasio Merck p.a.
- Alúmina activada Merck según Brockman.
- Isopropanol para espectroscopía. Uvasol Merck.
- Estandar de beta-caroteno Hoffmann La Roche.

Eter etílico p.a. libre de peróxidos⁵. Para obtener éter libre de peróxidos, se agita un litro de éter etílico con 5 a 10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a. y 1 ml de H_2SO_4 concentrado en un embudo de decantación, se separa la capa etérea, se seca con sulfato de sodio anhidro y se destila, recibiendo sobre nuevo sulfato de sodio anhidro.

Cloroformo Merck p.a. con 1°/o de etanol. Se debe someter al siguiente tratamiento: en un embudo de decantación se agitan 500 ml de cloroformo con tres porciones de 200 ml de agua destilada. Se decanta la capa clorofórmica y se deja sobre carbonato de potasio durante toda una noche, luego se separa y se destila, recibiendo sobre nuevo carbonato de potasio.

Solución clorofórmica de SbCl_3 . Se lavan los cristales agitándolos en un mortero con 20 ml de cloroformo recién desecado, de acuerdo al tratamiento descrito anteriormente. Luego se trituran y se pesa entre 21-23 g transfiriéndolos rápidamente a un matraz aforado de 100 ml, se completa el volumen con cloroformo y se guarda en frasco obscuro sobre sulfato de sodio anhidro.

En la preparación de este reactivo hay que tener especial cuidado de efectuar todas las operaciones dentro de un mínimo de tiempo, ya que el SbCl_3 capta humedad con facilidad, lo que se manifiesta porque la solución queda turbia, inutilizándola.

Alúmina activada según Brockman. Se calcina 50 g de alúmina a 600° C durante 4 horas. Se deja enfriar en desecador y se agita **enérgicamente** con 5 ml de agua en un matraz con tapa esmerilada. Se deja reposar durante 24 horas, al cabo de las cuales se vuelve a agitar, quedando lista para su uso inmediato.

MÉTODOS^{2,3,4}

1. Saponificación
2. Extracción
3. Separación cromatográfica en columna de alúmina
4. Determinación cuantitativa de caroteno por método **fotométrico**³.
5. Determinación cuantitativa de vitamina A por espectrofotometría y por colorimetría³.

Durante todo el desarrollo de las etapas es necesario proteger la vitamina A y carotenos de los agentes externos, para lo cual debe trabajarse en campanas oscurecidas y usar papel negro como protector.

Se aconseja realizar la determinación de caroteno y vitamina A en forma continuada y en el menor tiempo posible, para reducir al máximo las posibilidades de inactivación.

1. Saponificación

Esta etapa tiene por objeto **eliminar** la interferencia de la materia grasa.

- a) Para el caso de mantequillas y margarinas, se pesa exactamente $10 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ de muestra en un matraz de

500 ml de color ámbar o forrado en papel negro, se agrega 10 ml de KOH al 50^o/o; recién preparado (15 ml en el caso de las margarinas), 100 mg de hidroquinona, que actúa como antioxidante y 100 ml de etanol de 95^o. Esta mezcla se somete a calentamiento a reflujo durante media hora en baño de agua hirviendo, conectando a la vez el matraz con un cilindro de nitrógeno.

Mientras se está efectuando la saponificación es necesario agitar de vez en cuando y mantener un continuo burbujeo de nitrógeno para impedir la acción perjudicial del oxígeno sobre la vitamina A y caroteno.

- b) Para el caso de la leche, la saponificación se realiza agregando a 20 ml de leche 30 ml de una solución alcohólica de KOH al 20^o/o (20 g de KOH se disuelven en 100 ml de una mezcla que tiene una parte de agua destilada y nueve partes de alcohol etílico destilado de 95^o). Se deja la mezcla en la obscuridad durante toda la noche.

2. Extracción³.

Una vez finalizada la saponificación se realiza el vaciamiento cuantitativo a un embudo de decantación de 500 ml, obscuro o forrado con papel negro, enjuagando el matraz con 100 ml de agua destilada, que se agrega al mismo embudo.

Se extrae con tres porciones de 100 ml de una mezcla de partes iguales de éter etílico y éter de petróleo previamente desecada con sulfato de sodio anhidro.

Los extractos etéreos se reúnen en un embudo de decantación, se lavan con agua destilada hasta que no haya reacción alcalina, se desecan con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se destila al vacío en baño de agua a no más de 40^o C. En la destilación hay que tener la precaución de no evaporar a sequedad para evitar pérdida de actividad de la vitamina A. La concentración se efectúa hasta tener un volumen de unos 2 ml; este líquido debe mostrarse claro y transparente, libre de humedad, ya que cualquier indicio de agua impide la determinación.

3. Separación cromatográfica en columna de alúmina activada.

La alúmina se suspende en éter de petróleo, se vierte cuidadosamente a la columna de vidrio hasta una altura de 10 cm, se agrega en la parte superior una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro para mayor seguridad en la desecación y se forra con papel negro.

El caroteno se eluye con pequeñas porciones de éter de petróleo desecado con sulfato de sodio anhidro, en forma de un anillo amarillo que va descendiendo por la columna. Si se observa que la elución es muy lenta, se puede acelerar con éter de petróleo que tiene 3^o/o de acetona v/v.

En la parte superior de la columna se visualiza la vitamina A por su rápida observación a la lámpara de luz ultravioleta como un anillo fluorescente amarillo-verdoso. Para eluir la se empieza por agregar pequeñas porciones de una mezcla de éter de petróleo con 25^o/o de éter etílico v/v, desecada con sulfato de sodio anhidro.

La banda va migrando lentamente hacia el extremo inferior de la columna, su posición se examina de vez en cuando a la luz ultravioleta.

Cuando el borde de la zona de fluorescencia dista 2 cm del extremo de la columna, se comienza a recoger la vitamina A, hasta que ya no se observa fluorescencia en el eluido.

4. Determinación cuantitativa de caroteno.

El eluido se recoge directamente en un matraz volumétrico de 25 ml, se afora con el mismo solvente y se lee la absorbancia a 451 nm en cubetas de vidrio de 1 cm, usando éter de petróleo como blanco.

Curva de calibración de caroteno. 10 mg de Beta-caroteno estándar (Hoffman La Roche) se disuelven en 1 ml de cloformo y se afora a 100 ml con éter de petróleo (1 ml = 100 mcg). Luego se diluyen 10 ml a 100 ml con éter de petróleo (1 ml = 10 mcg).

Para obtener la curva se miden: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 ml de la última dilución, aforando cada vez con 10 ml de éter de petróleo que contiene 3^o/o de acetona, presentando la curva respectivamente las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mcg de beta-caroteno.

Prueba de recuperación de caroteno. Se agrega una determinada cantidad de solución tipo de caroteno a una muestra ya analizada, eligiendo una cantidad que corresponde a más o menos la mitad de lo que contiene la muestra. Se sigue el método ya descrito y se determina el porcentaje recuperado.

5. Determinación espectrofotométrica de vitamina A.

- a) Método espectrofotométrico. Luego de eluir totalmente la vitamina A, el solvente se evapora por arrastre con burbujeo de nitrógeno; el residuo se disuelve en isopropanol "Uvasol" y se traslada cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml completando el aforo con el mismo solvente; la concentración de las muestras finales debe ser de 10 a 15 UI/ml.

Se lee la absorción de la solución isopropanólica a **310,325** y **334** nm en cubetas de cuarzo de 1 cm, usando isopropanol como blanco.

La extinción corregida se calcula por la siguiente fórmula:

$$E_{\text{corr.}} = 6,815 E_{325} - 2,555 E_{310} - 4,26 E_{334}$$

Para calcular el resultado en Unidades Internacionales (U.I.) se aplica la fórmula:

$$\frac{E_{\text{corr.}}}{c \cdot d} \times 1830 = \text{U.I. de Vitamina A por g}$$

En esta fórmula, "c" representa los g de material analizado que corresponde a 100 ml de la solución isopropanólica final y "d" es el espesor de la cubeta.

- b) Método **colorimétrico**³. Se toma una alícuota de **4 ml** de la solución isopropanólica; se evapora el solvente por burbujeo de nitrógeno, se disuelve el residuo en 1 ml de cloroformo seco y se traslada cuantitativamente a una cubeta de vidrio de 1 cm. En la misma cubeta se agrega 2 ml de solución de SbCl_3 y se lee a **625** nm, usando una cubeta vacía como blanco. La lectura debe hacerse rápidamente dentro de los **8** segundos siguientes a la adición del reactivo, ya que la coloración azul es muy fugaz.

Curva de calibración de vitamina A. 50 mg de acetato de vitamina A crist. se disuelven en cloroformo hasta completar 50 ml; 1 ml de esta solución se diluye con cloroformo hasta completar 50 ml y 1 ml de ésta se diluye con cloroformo hasta **100 ml (1 ml = 10 mcg de acetato de vitamina A)**.

En cubeta de 1 cm se colocan los siguientes volúmenes de esta solución:

0,2 ml = 2 mcg de acetato de Vit. A = **5,81** U.I. de Vit. A

0,3 ml = 3 mcg de acetato de Vit. A = **8,72** U.I. de Vit. A

0,4 ml = 4 mcg de acetato de Vit. A = **11,63** U.I. de Vit. A

0,5 ml = 5 mcg de acetato de Vit. A = **14,54** U.I. de Vit. A

0,6 ml = 6 mcg de acetato de Vit. A = **17,44** U.I. de Vit. A

y cada uno se completa a **1 ml** con cloroformo. Se agrega a cada uno **3 ml** de la solución de SbCl_3 y se miden las extinciones a **620** nm dentro de **8** segundos (entre dos personas). Se enfrentan en una curva las extinciones medidas con las respectivas concentraciones.

Prueba de recuperación de vitamina A. Se efectúa en la misma forma descrita para caroteno.

DETERMINACION QUIMICA DE TIAMINA^{3, 4, 7, 12}

FUNDAMENTO:

Se basa en la oxidación de la tiamina a tiocromo y en medir la fluorescencia de éste, pues es proporcional a la concentración de tiocromo, y por lo tanto de la tiamina presente.

La determinación comprende las siguientes fases:

- Aislamiento:** Excepto en cereales y derivados, la mayor parte de la tiamina existe en alimentos al estado de ésteres orto y pirofosfóricos y unida a proteínas, como es el caso de la carboxilasa, combinación del pirofosfato de tiamina o co-carboxilasa con proteína y magnesio. Como todos estos compuestos de la tiamina no son directamente oxidables o no se extraen con isobutanol, la tiamina debe aislarse al estado libre, por **hidrólisis enzimática**, antes de su reacción con el tiocromo.
- Extracción:** Los productos sólidos deben disgregarse lo más posible por el mortero o molinillo mecánico o eléctrico. La tiamina debe extraerse en medio ácido y en caliente pues se descompone en solución neutra o alcalina. Se extrae por digestión a **95-100° C** o al autoclave a **108-109° C**.
- Enzimólisis:** Pueden usarse diversas enzimas de actividad proteolítica y fosfatásica para degradar, a la vez, los componentes proteicos **denaturalizados** por el calentamiento en medio ácido y los ésteres fosfóricos, como la takadiastasa o clarasa que actúan a **45-50° C**, durante **3** horas.
- Purificación del extracto:** Para evitar la interferencia de componentes fluorescentes, diferentes a la tiamina y de compuestos reductores que consumen ferricianuro en la oxidación, se recurre a una

purificación del extracto. **Se** usa una resina de intercambio iónico, como **Decalso** que retiene la tiamina junto con otros cationes; en cambio los aniones y sustancias no ionizadas emigran con el solvente, al lavar la columna con la resina. Posteriormente, la tiamina **se** eluye con solución de cloruro de potasio acidificada y en caliente.

- e) Oxidación: El eluido de KCl que contiene la vitamina se adiciona de una solución oxidante, constituida por ferricianuro de potasio y NaOH y **se** agita inmediatamente con isobutanol. **Se** hace indispensable realizar junto con la muestra un ensayo con un blanco que no **se** adicionó de ferricianuro de potasio y, además, otro ensayo con una solución tipo de tiamina, también con su respectivo blanco.

MATERIAL NECESARIO:

- Mezcladora eléctrica (Waring-Blendor)
- Matraces Erlenmeyer de **250 ml**
- Pipetas volumétricas de **2, 3, 4, 25 ml**
- Columnas de adsorción
- Probetas graduadas de **25 ml** (con tapón esmerilado)
- Tubos separadores de centrífuga con tapón esmerilado
- Centrífuga
- Fotofluorómetro.

REACTIVOS NECESARIOS:

Solución madre de clorhidrato de **tiamina**: Se disuelven **60 mg** de clorh. tiamina, los cuales hayan sido previamente desecados sobre pentóxido de fósforo, en alcohol **al 25^o/o** (llevado a un pH de **3,5 - 4,3**, con ácido clorhídrico concentrado) y se entera un volumen de **500 ml**. **Se** guarda en un frasco obscuro y en refrigeración, pudiendo ser usada durante cuatro **meses** (**1 ml = 0,12 mg** de tiamina).

Dilución **N^o 1**. Se diluyen **10 ml** de la solución madre a **100 ml** con agua destilada (llevada previamente a un pH de 4,5, con ácido clorhídrico). Se guarda en frascos oscuros y en refrigeración (**1 ml = 0,012 mg**).

Dilución **N^o 2**. Se diluyen **10 ml** de la dilución **N^o 1** a **100 ml** con agua destilada **que** haya sido acidificada con **ác. clorhídrico N/10**. Se guarda en frasco oscuro y en refrigeración (**1 ml = 0.0012 mg**).

Solución de trabajo. Se diluyen **10 ml** de la dilución **N^o 2**, más **70 ml** de ácido clorhídrico **N/10** (o el ácido correspondiente al usado en la preparación de la papilla). Se autoclava **30 min** a **121-123^o C**. **Se** enfría y **se** agrega **5 ml** de la solución de enzima, se incuba a **37^o C** durante **18 horas** y **se** lleva a **100 ml** con **agua destilada**. Se debe preparar esta solución cada vez que se hace un ensayo (**1 ml = 0,12 mcg**; **5 ml = 0,6 mcg**).

- Acido sulfúrico **0,1 N**.
- Acido clorhídrico **0,1 N**.
- Acido acético **al 3^o/o** (v/v).
- Solución de cloruro de potasio **al 25^o/o** en ácido clorhídrico **0,1 N (p/v)**.
- Hidróxido de sodio **al 15^o/o** (p/v).
- Acetato de sodio **2,5 M**.
- Solución de ferricianuro de potasio **al 1^o/o** (p/v). Esta solución **se** debe guardar en un frasco ámbar y no debe usarse más de una semana.
- Isobutanol, previamente tratado con carbón activado o por destilación para remover las sustancias fluorescentes.
- Sulfato de sodio anhidro. Debe estar libre de materias fluorescentes.
- Decalso preparado. ("Special Decalso for Thiocrome determination" from Fisher Scientific Co. 717 Forbes St. Pittsburgh 19, Pa). **Se** colocan **100-500 g** de Decalso (50-80 mesh) en un vaso o Erlenmeyer y se agitan **10 a 15 min.**, con un volumen **8 ó 10** veces mayor de ácido acético **al 3^o/o**, caliente y se hierve **10 a 15 min.** agitando continuamente. **Se** deja reposar y **se** decanta la solución ácida. Se repite este tratamiento cuatro **veces**. Entre la tercera y la cuarta vez, se trata el Decalso de una manera similar con solución acidificada de cloruro de potasio **al 25^o/o** en **HCl 0,1 N**; ealintte. **Se** lava nuevamente con la solución de ácido acético **al 3^o/o** y luego con suficiente agua hirviendo hasta que esté libre de cloruros. **Se** seca a **100^o C**.

Soluciones que han de prepararse cada **día inmediatamente** antes de usarse:

- Solución de **enzima**. Se disuelve **0,3 g** de takadiastasa (Parke Davis) o Clarasa (Miles Lab. Elkhart, Indiana) en **5 ml** de solución **2,5 M** de acetato de sodio. Esta cantidad **se** prepara para **cada** muestra y para la solución tipo de trabajo.

- Mezcla de ferricianuro de potasio. 1 ml de solución acuosa de ferricianuro de potasio al 1^o/o (de preparación reciente), se lleva a 30 ml con solución de hidróxido de sodio al 15^o/o. Debe usarse en plazo máximo de 4 horas.

PROCEDIMIENTO:

- Extracción de la tiamina de la muestra. Se pesa una porción de la muestra previamente homogeneizada en mezcladora eléctrica, estimando que no contenga más de 20 mcg de tiamina (preferentemente 10-12), usando para esto matraces de 250 ml. Se agregan 70 ml de HCl N/40 ó H₂SO₄ N/10 en productos farináceos (filtra mejor). Se calienta la mezcla durante 30 min. en baño de agua hirviendo o en autoclave a 121-123^o C durante 30 min. Si es necesario se puede aumentar el tiempo hasta 1 hora.
- Tratamiento del extracto con enzima. Después de sacar las muestras del baño, se enfrían bajo 50^o C. Se agrega a cada muestra 5 ml de la solución de enzima. Se ponen las muestras a una temperatura constante de 50^o C (por 2 ó 3 horas) o a 37^o C (por 18-20 horas).
- Purificación de las muestras. Al terminar el período de digestión enzimática, el extracto se lleva a un volumen de 100 ml con agua destilada. Si el volumen de materias insolubles es muy grande se centrifuga la mezcla y se decanta el líquido sobre un matraz aforado. Se lava el residuo sólido varias veces y se centrifugacadevez. Los lavados, junto con el líquido original se llevan a 100 ml. Se filtra el extracto, descartando los primeros 10 ml.
- Preparación de las columnas de adsorción. Se usan columnas cromatográficas de vidrio, compuestas de tres partes: 1) tubo de adsorción de 145 mm de largo y 6 mm de diámetro; 2) parte superior o reservorio, de 95 mm de largo y 30 mm de diámetro; 3) tubo capilar de 35 mm de largo y de diámetro tal que cuando el tubo, se carga, la velocidad no debe ser mayor de 1 ml/min. Se preparan de la manera siguiente: Se coloca un pequeño tapón de algodón hidrófilo sobre la parte capilar del tubo, por medio de una varilla de vidrio y se comprime. Se pone el Decalso preparado (suspendido en agua) dentro del tubo, directamente sobre el tapón hasta una altura de 145 mm. Se lava la columna con agua destilada, debiendo conservarse húmeda hasta el momento de usarse, se lava con 10 ml de solución de ácido acético al 3^o/o. El promedio de goteo de la columna ya preparada debe ser de 1 gota cada 2 ó 3 segundos.
- Para valorar la tiamina se pipetea una alícuota del filtrado de la muestra (25 ml) estimando que contenga de 2 a 4 mcg de tiamina, dentro del bulbo de la columna de adsorción ya preparada. Tan pronto como ha pasado el líquido puesto en el bulbo de la columna, se lavan las paredes con 10 ml de agua destilada hervida y caliente. Cuando hayan pasado, se repite la operación dos veces más. No se debe permitir que la columna se seque. Cuando el agua ha terminado de pasar a través de la columna de adsorción, se coloca bajo el vástago de la columna un matraz volumétrico de 25 ml con tapón esmerilado, y se eluye la tiamina con pequeñas porciones de la solución acidificada y caliente de cloruro de potasio al 25^o/o. Una vez frío, se afora a 25 ml con la misma solución de cloruro de potasio. A la solución tipo de tiamina (solución tipo de trabajo) se le da el mismo tratamiento que a los extractos de las muestras (a partir de e).
- Determinación de tiamina como tiocromo. Se preparan dos tubos separadores de centrífuga con tapón esmerilado de la manera siguiente: (el orden y el tiempo usados tanto en las muestras como en el tipo deben cuidadosamente ser seguidos) se agregan 5 ml o una cantidad cualquiera del líquido que no contenga más de 1,0 mcg ni menos de 0,2 de tiamina. Si se usa un volumen inferior a 5 ml se debe agregar suficiente cantidad de la solución acidificada de cloruro de potasio para completarlo. A uno de los tubos de centrífuga se agregan 3 ml de ferricianuro de potasio alcalino y al otro tubo 3 ml de hidróxido de sodio al 15^o/o; se agita y se agrega inmediatamente un volumen adecuado (13-20 ml) de isobutanol. La cantidad de isobutanol agregada varía según el tipo de cubeta usada para la lectura al fluorómetro. El tubo que contiene NaOH al 15^o/o actúa como blanco de la muestra. Se tapan los tubos, ajustando los taponés de vidrio y se agita vigorosamente por 1,5 min. Se centrifugan los tubos a baja velocidad por 1/2 min. Se decanta la capa inferior del tubo, la cual es una mezcla de álcali y agua, por medio de un sifón. Se agrega 1 a 2 g de sulfato de sodio anhidro. Se agitan los tubos y se centrifugan a baja velocidad, por 15 a 30 seg. Se transfiere el isobutanol a una cubeta y se lee la fluorescencia en un fluorómetro adecuado, usando un filtro interior con un rango de transmitancia máxima de aprox. 365 nm y el exterior de aprox. 435 nm. Existen también prismas de fluorescencia patrón tanto para el tiocromo como para la riboflavina.

- g)** Cálculos. Ejemplo. 15 g (**peso** inicial de la muestra) **se** completaron a 100 ml (en fase c). De éstos **se** pasaron 25 ml por Decalco (en fase e) **y** de éstos **se** oxidaron 5 ml a tiocromo.
Concentración de los 5 ml de la sol. de trabajo = 0,6 mcg de tiamina.
Ejemplos de lecturas:
Tipo 45; Blanco: 15; Diferencia: 30
Muestra: 35; Blanco: 15; Diferencia: 20
Por lo tanto: a una lectura de 30 corresponden 0,6 mcg tiamina.
A una lectura de 20 corresponden **X** mcg tiamina.
 $X = 0,4$ mcg en los 5 ml y 8 mcg en 100 ml.
15 g de muestra contenían 8 mcg = 0,008 mg tiamina
100 g de muestra contenían **0,053**mg tiamina.

DETERMINACION QUIMICA DE RIBOFLAVINA^{3, 4, 7, 8, 12}

FUNDAMENTO:

Se basa en medir su fluorescenciapropia en un fluorómetro que aprecie 0,05 a 0,2 mcg/ml de riboflavina.

MATERIALES NECESARIOS:

- Matraces Erlenmeyer de 50 y 250 ml.
- Probetas con tapón esmerilado de 25 a 100 ml.
- Pipetas volumétricas de 1,5,10 y 25 ml.
- Columnas de adsorción.
- Embudos pequeños de vástago largo.
- Centrífuga.
- Mezcladora eléctrica.
- Fotofluorómetro de Pfaltz & Bauer (Modelo B).

REACTIVOS NECESARIOS:

- Solución madre de riboflavina. **Se** disuelven 50 mg de riboflavina estandar (previamente desecada al abrigo de la luz, en desecador con P_2O_5) en ácido acético 0,02 N y **se** completan 500 ml. Para facilitar la solubilidad se agregan a los 50 mg de riboflavina 300 ml de ácido acético 0,02 N y se calienta al baño de agua con agitación constante hasta que la riboflavina se disuelva. **Se** enfría y se completa los 500 ml con ácido acético 0,02 N. **Se** guarda bajo tolueno a 10° C (1 ml = 100 mcg).
- Dilución 1. A 10 ml solución madre, agregar *agua* y completar 100 ml (1 ml = 10 mcg riboflavina).
- Solución de trabajo. A 10 ml dilución 1 agregar agua **y** Completar 100 ml en el momento de usar. (1 ml = 1 mcg riboflavina).
- Solución de hidróxido de sodio N.
- Solución de ácido sulfúrico 0,1 N.
- Solución de ácido clorhídrico N.
- Acido acético glacial.
- Ditionito o hidrosulfito de sodio p.a. (purísimo) $Na_2S_2O_4$.

Las soluciones siguientes se preparan inmediatamente antes de usarse:

- Solución al 4°/o de permanganato de potasio.
- Solución al 3°/o de agua oxigenada. **Se** diluye 10 ml de agua oxigenada al 30°/o a 100 con agua destilada.
- Solución de enzima. Se disuelven 0,3 g de Takadiastasa (Parke Davis) en 5 ml de solución 2,5 M de acetato de sodio. Esta cantidad se prepara para cada muestra. (Igual que para tiamina).

PROCEDIMIENTO:

Extracción: En los productos naturales la riboflavina se encuentra parcialmente combinada al estado de éster 5'-fosfórico, unido a proteína. La extracción con ácido diluido en caliente, seguida de enzimólisis como se hace en la extracción de la tiamina, permite liberar la riboflavina. Por este motivo puede usarse otra porción alícuota (20 ml) de la misma solución extractiva que se prepara para determinar tiamina, una vez realizada la enzimólisis y completados 100 ml (en fase c). Pero toda la extracción debe hacerse al abrigo de la luz, debido a su gran fotosensibilidad, debiendo usarse aparatos de vidrio obscuro o por lo menos envueltos en papel negro, sobre todo mientras se extrae en caliente.

Purificación: Para evitar pérdidas de riboflavina debe mantenerse la solución a pH inferior a 7, eliminándose sustancias interferentes por ajustes de pH y por oxidación con permanganato de potasio; a veces también por adsorción por Florisil.

Una vez hecha esta purificación y con el objeto de descartar las demás fluorescencias extrañas de la muestra se toman aún dos medidas:

- Se trabaja con un estándar interno, para lo cual se agrega, antes del tratamiento con permanganato a una alícuota de la solución de la muestra, agua destilada y a la otra un volumen igual de una solución conocida de riboflavina en vez de agua; la aplicación de este estándar interno sirve para compensar los efectos de concentración que afectan la fluorescencia de la riboflavina pues la fluorescencia de la riboflavina añadida se altera por las sustancias interferentes en la misma proporción que la contenida en la muestra.
- Se prepara un blanco, destruyendo la fluorescencia propia de la riboflavina por reducción a leucoflavina, no fluorescente. Esto se logra por adición de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) a una porción alícuota de la solución de la muestra y restando el valor obtenido para la fluorescencia residual de la lectura obtenida antes del tratamiento.

TECNICA:

Una alícuota (20 ml) de extracto de fase c, al determinar tiamina se lleva a pH 6.8 con NaOH y se filtra en caso necesario. Luego se agrega HCl hasta pH 4.5, se vuelve a filtrar en caso necesario y se afora a 25 ml con agua. En dos tubos se colocan 10 ml de muestra, se agrega a un tubo 1 ml de solución de trabajo de riboflavina y al otro tubo 1 ml de agua. A ambos se agrega 1 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml de KMnO_4 al 4°/o (esta cantidad puede ser aumentada para aquellas muestras que tienen exceso de materias oxidables, pero con no más de 0,5 ml de exceso). Se deja reposar 2 min. y luego se añade a cada tubo 0,5 ml de H_2O_2 al 3°/o. (El color del permanganato debe ser destruido en 10 seg). Se agitan los tubos hasta expulsar todo el exceso de O_2 y se filtra o centrifuga en caso de turbidez o pp. La medida de fluorescencia se hace en un fluorómetro adecuado, usando un filtro interior con un rango de transmitancia de aprox. 440 nm y uno exterior, de aprox. 565 nm. La fluorescencia (a 440-500 nm) del tubo que contiene la solución de muestra más 1 ml de solución de trabajo de riboflavina, la llamaremos lectura "A". La fluorescencia del tubo que contiene solución de muestra más 1 ml de agua la llamaremos "B". Se añaden 20 mg de hidrosulfito de sodio en polvo ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, p.a. conservado al abrigo de la luz y del aire) a este tubo de la fluorescencia "B" se lee nuevamente; esta última lectura la llamaremos "C".

CALCULOS:

Ejemplo: 15 g (peso inicial de la muestra), se completaron a 100 ml (en fase c de tiamina) y del filtrado se midió una alícuota de 20 ml aforando después a 25 ml, de los cuales se tomaron 10 ml. Concentración de 1 ml de la solución de trabajo = 1 mcg riboflavina.

Ejemplos de lecturas: "A" "B" "C"
30 10 2

Por lo tanto, la lectura de la solución de trabajo de riboflavina (estándar interno) fue: $30-10 = 20$ y la lectura de la muestra $10-2 = 8$.

Luego, a una lectura de 20 correspondieron 1 mcg de riboflavina y a una lectura de 8 correspondieron X mcg de riboflavina.

$X = 0,4$ mcg contenidos en una alícuota de 10 ml.

Si la alícuota de 10 ml contenía 0,4 mcg de riboflavina, una alícuota de 25 ml contenía 1 mcg riboflavina, 20 ml de la solución de la muestra contenían también 1 mcg riboflavina y 100 ml de la solución de la muestra contenían entonces 5 mcg de riboflavina.

15 g de muestra contenían 5 mcg = 0,005 mg de riboflavina y 100 g de muestra contenían 0,033 mg de riboflavina.

DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO^{3, 4, 7, 9, 10, 12}

Los métodos volumétricos para determinar ácido ascórbico libre se basan en su fuerte acción reductora sobre agentes químicos como el yodo o sobre colorantes como el 2,6-diclorofenol-indofenol sódico.

A. Método de Tillmans

FUNDAMENTO:

El método se basa en la reducción del 2,6 diclorofenol-indofenol (cuya sal sódica **es** de color rosa fuerte en medio ácido y azul en medio alcalino, neutro o débilmente ácido) por el ácido ascórbico, pasando a la leucobase incolora. Tillmans titulaba en medio neutro, pero **se** encontró que en esas condiciones una serie de cuerpos reductores, presentes en los productos naturales, interfieren en la titulación. Para hacer más específico el método otros autores propusieron hacer las titulaciones en medio fuertemente ácido.

Este método **se** adapta a frutas y verduras con **3** a **20** mg ^{o/o} de ácido ascórbico directamente reductor.

MATERIAL NECESARIO:

- Mezcladora eléctrica, inoxidable.

REACTIVOS NECESARIOS:

- Acido oxálico al **0,5^{o/o}** o ácido tricloroacético al **5^{o/o}** o ácido metafosfórico al **1^{o/o}**.
- Solución acuosa de sal sódica del **2.6** diclorofenol-indofenol (**25** mg ^{o/o}).
- Solución de almidón al **1^{o/o}**.
- Solución de ácido ascórbico de concentración conocida.

Se debe tener presente que siempre hay que comprobar la pureza del ácido ascórbico. Para ello es necesario titular una solución de concentración conocida con una solución de yodo 0,01 N. Se pesan **100** mg de ácido ascórbico y se disuelven en ácido oxálico al **0,5^{o/o}**, enterando un volumen determinado (**100** **ml**). **Se** titulan **5** ml de la solución de ácido ascórbico al **100** mg ^{o/o} con la solución de yodo 0,01 N en presencia de almidón.

1 ml de solución de yodo 0,01 N.....0.88 **mg** de ácido ascórbico

$$\text{o/o de ácido ascórbico} = \frac{A \times (f) 0,88 \times 100}{5}$$

de donde:

A: ml de solución de yodo gastadas.

(f): factor del yodo 0,01 N.

Si en dos titulaciones **se** gastan por ej. para **5** ml de solución de ácido ascórbico **5,2** **ml** de yodo 0.01 N. se tiene aue:

$$\text{o/o ácido ascórbico} : \frac{5,2 \times 0,88 \times 100}{5} = 91,52\text{o/o}$$

Determinación del Titulo de la solución **2,6-diclorofenol-indofenol**.

Para ello se pesan **29** mg de la sal sódica, se disuelven en un poco de agua caliente y se entera un volumen de **100** ml. Se debe titular cada vez **5** **ml** de esta solución colorante con una solución de ácido ascórbico que contenga **20** mg ^{o/o}.

Pero, como en el ejemplo anterior, la pureza del ácido ascórbico alcanzó sólo el **91,52^{o/o}**, la concentración verdadera de la solución de ácido ascórbico al **20** mg ^{o/o} **es** sólo de **18,30**.

Sabiendo que la concentración del ácido ascórbico **es** de **18,30** mg ^{o/o}, se tiene que, por ejemplo al titular la solución colorante:

5 ml de colorante gastan **2,8** ml de solución de ácido ascórbico.

Entonces:

100 ml de solución contienen **18,30** mg de ácido ascórbico

2,8 ml de solución contienen **x** mg de ácido ascórbico

$$X = \frac{18,30 \cdot 2,8}{100} = 0,51 \text{ mg de ácido ascórbico}$$

Por lo tanto, **5** ml de la solución colorante corresponde a **0,51** mg de ácido ascórbico (título).

TECNICA:

Para titular la vitamina C en un producto cualquiera (vitamina C directamente reductora) se procede a pesar una cantidad determinada (10 g) que se homogenizan en una mezcladora eléctrica con cualquiera de los 3 ácidos estabilizantes (recomendamos el ácido oxálico al 0,5^o/o) y se lleva con el mismo ácido a 100 ml (o a otro volumen según la cantidad de ácido ascórbico presente). Si es necesario, la solución puede centrifugarse o filtrarse.

En una cápsula se colocan 5 ml de la solución colorante de 2,6 diclorofenol-indofenol de título conocido y se deja caer desde una bureta la solución problema. El colorante vira del azul al rosado (por cambio de pH) para luego llegar al incoloro.

Ejemplo al titular la solución problema se gastan 4,5 ml luego:

5 ml de colorante corresponde a 4,5 ml de solución

4,5 ml de solución corresponde a 0,51 mg de ácido ascórbico

100 ml de solución X

X = 11,3 mg para 10 g de producto. Para 100 g de producto corresponden 113 mg de ácido ascórbico.

B. Método de la Dinitro-fenilhidrazina

FUNDAMENTO:

El método, aunque bastante usado, sin embargo, da valores demasiado altos, si existen en la solución otras sustancias reductoras como compuestos orgánicos con grupos sulfidrilos y el anhídrido sulfuroso, presente como aditivo. Además, el 2,6-diclorofenol-indofenol no reacciona con el ácido dehidroascórbico, presente en los productos naturales y dotado también de actividad fisiológica de la vitamina C.

Si se desea determinar el ácido ascórbico total el método más recomendable se basa en oxidar primero el ácido ascórbico a dehidroascórbico con diclorofenol-indofenol y en hacer reaccionar luego el ácido dehidroascórbico con la 2,4 dinitrofenilhidrazina para formar la 2,4 dinitrofenilhidrazona, de coloración rojiza y con un máximo de absorción a 520 nm. Esta reacción se realiza en presencia de H₂ SO₄ al 85^o/o a 37^o C y de tiourea que impide la descomposición del ácido dehidroascórbico durante su condensación con la hidrazina.

REACTIVOS NECESARIOS:

- Solución de diclorofenol-indofenol. Se disuelven 200 mg del D.C.F.Na en 100 ml de agua caliente, se filtra y se guarda en refrigerador. La solución se conserva durante dos semanas.
- Solución de ácido oxálico-tiourea. Se disuelven 2 g de tiourea y 0,5 g de ácido oxálico en agua destilada, aforando a 100 ml.
- Ácido sulfúrico aproximadamente 9 N. Se agrega un volumen de ácido sulfúrico concentrado (d= 1,84), a tres volúmenes de agua destilada. Se enfría.
- 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se disuelven 2 g de este reactivo en 100 ml de ácido sulfúrico aproximadamente 9 N y se filtra.
- Ácido sulfúrico al 85^o/o. A 100 ml de agua destilada se agregan 900 ml de ácido sulfúrico concentrado (d= 1,84). Se enfría.
- Solución tipo de ácido ascórbico. Se disuelven 50 mg de ácido ascórbico p.a. (previamente deseados al menos durante 24 horas sobre pentóxido de fósforo) en agua destilada, completando luego a un volumen de 100 ml. Se controla su pureza por titulación con solución de yodo 0,01 N (1 ml de solución de yodo 0,01 N equivale a 0,88 mg de ácido ascórbico). Esta solución contiene 500 mcg o sea 0,5 mg de ácido ascórbico por ml. Para la preparación de la curva es mejor preparar una solución fresca, revisándola cada vez que se trabaje con uno o dos puntos de la misma. La solución guardada en refrigerador se conserva durante tres semanas.

Preparación de la Escala:

Se pipetea 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ml de la solución tipo de ácido ascórbico a matraces aforados de 100 ml completando el volumen con la solución de ácido oxálico al 0,5^o/o. Estas soluciones tendrán respectivamente 0; 5; 10; 15; 20; y 25 microgramos por ml.

PREPARACION DE LA MUESTRA:

Se pesa cierta cantidad del material a ensayar, se le agrega suficiente ácido oxálico al 0,5^o/o y se homogeniza en la mezcladora eléctrica durante 2 minutos. Si es necesario, se centrifuga el líquido resultante y luego se filtra. Si el filtrado resulta turbio, se le adiciona igual volumen de ácido tricloroacético al 10^o/o, se vuelve a filtrar, aforando luego un volumen determinado (factor de dilución inicial f.d.i.). Si se dispone de poco material, a la cantidad pesada se le agrega ácido oxálico al 0,5^o/o y se homogeniza con ayuda de una varilla de vidrio, luego se vierte la papilla a un colador de plástico y se la hace pasar, presionando con una

cuchara de este mismo material. Se recibe en un matraz aforado de 100 ml y luego se completa el volumen con la solución de ácido oxálico al 0,50/o.

PROCEDIMIENTO:

Se pipetea 3 veces 2 ml de cada una de las soluciones de la escala y del filtrado de la muestra en tres tubos marcados de espectrofotómetro. Se agrega a cada tubo 1 gota de solución de indofenol y se mezcla. Algún color debe persistir; si no, es que el ácido ascórbico es muy concentrado para obtener buenos resultados, debiendo entonces diluirse con ácido oxálico al 0,50/o. Se agrega a cada tubo 2 ml de solución de ácido oxálico-tiourea. Se separa un tubo de cada grupo como testigo, y se agrega a los otros dos 1 ml de la solución de dinitrofenilhidrazina. Se colocan los tubos a 37° C durante tres horas exactas, al final de las cuales se transfieren directamente a un baño con hielo.

Cuando el contenido de los tubos esté frío y siempre en el baño de hielo, se agrega a cada tubo 5 ml de ácido sulfúrico al 850/o. El ácido debe agregarse lentamente y agitando el tubo continuamente, para prevenir la carbonización, al elevarse en forma brusca la temperatura. La llave de la bureta que se usa para agregar el ácido debe estar libre de grasa, pudiendo lubricarse con el mismo ácido. Los tubos se agitan vigorosamente. Se agrega 1 ml de la solución de dinitrofenilhidrazina al tubo testigo.

Los tubos se sacan del baño de hielo, se limpian y se secan, colocándolos en una gradilla. Se dejan en reposo hasta que estén a temperatura ambiente (30 minutos). Se frota los tubos con un paño limpio y se lee la intensidad de color en un fotocolorímetro. También se puede leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520-525 nm.

Se traza la curva colocando las densidades ópticas contra las concentraciones por ml.

CALCULO:

$$\text{mg Vit. C/100 g de muestra} = \text{mcg/ml} \times \frac{100}{\text{ml de la alícuota tomada}} \times \frac{100}{1000} \times \text{f.d.i.}$$

(f.d.i.) = factor de dilución inicial

Ejemplo: Se pesaron 20 g de fruta (tuna), preparándose la muestra de acuerdo a la técnica descrita. Se aforó a un volumen de 200 ml (f.d.i.). Se tomó en seguida una alícuota de 25 ml (ml de la alícuota tomada) y se completó un volumen de 100 ml.

Las D.O. obtenidas en el espectrofotómetro fueron 0.17 y 0.165; promedio 0.167. Esta lectura, interpolada en la curva, dio como resultado 5,36 mcg/ml de ácido ascórbico.

Para calcular los mg de ácido ascórbico por 100 g de muestra se aplica la fórmula indicada más arriba:

$$\begin{aligned} \text{mg Vit. C/100 g de muestra} &= \\ 5,36 \times \frac{100}{25} \times \frac{100}{1000} \times \frac{200}{20} & \\ = 5,36 \times 4 \times 0,1 \times 10 &= 21,44 \end{aligned}$$

Si la concentración de azúcares solubles es alta, como sucede en jarabes, zumos de frutas, etc., éstos reaccionan, formando dinitrofenilhidrazonas, de manera que se obtienen resultados demasiado altos. En estos casos se hace necesario separar los azúcares mediante la cromatografía en capa fina con placas de sílica-gel, sobre las cuales se aplican los precipitados de las dinitrofenilhidrazonas previamente redissueltos en acetona. Usando como solvente de arrastre una mezcla de cloroformo/acetato de etilo/ácido acético (60 + 35 + 5), se separan bien las zonas de color rojo que corresponden al ácido dehidroascórbico de las de color amarillo, debidas a los azúcares. Se retiran entonces con espátulas las zonas rojas; el polvo resultante se trata con ácido sulfúrico al 850/o y se centrifuga. Se mide la intensidad de color de esta solución en la forma indicada.

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS¹¹

FUNDAMENTOS:

Estos métodos se basan en la observación que ciertos microorganismos requieren determinada vitamina para su crecimiento. Usando un medio basal completo, excepto la vitamina a titular, las respuestas del crecimiento del microorganismo dependerán cuantitativamente de la cantidad de vitamina presente en la solución tipo y en la muestra problema.

Según el método de Observación del crecimiento del microorganismo, pueden distinguirse cuatro grupos de ensayos microbiológicos:

- Fermentación de levadura y medida del gas producido, como se puede usar, para valorar tiamina.
- Crecimiento bacteriano y medida de la turbidez resultante. Se puede usar para el ácido fólico, con el *Streptococcus lactis R.*
- Crecimiento de hongos y determinación del peso del micelio resultante. Se puede usar para la piridoxina con la *Neurospora sitophila.*
- Fermentación láctica y determinación de la acidez resultante por titulación o medida del pH. Se recurre al *Lactobacillus casei*, por ejemplo, para la determinación de riboflavina, biotina y ácido pantoténico y al *Lactobacillus plantarum*, para la determinación de la niacina.

VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE NIACINA^{11, 12}

Se preparan dos series de tubos, una con cantidades crecientes de niacina pura y la otra, con cantidades crecientes de solución problema. Ambas series se adicionan de medio basal que suministran al germen todos los nutrientes necesarios para su desarrollo, menos niacina, y se esterilizan. Se inoculan con un cultivo de *Lactobacillus*, incubando luego el tiempo necesario para el desarrollo. Se titula la acidez resultante en cada tubo y se establece la curva que relaciona los ml de hidróxido de sodio gastados con la concentración de niacina.

Reparación de la muestra. Se pesa una cantidad determinada (2 g) del producto finamente pulverizado y se hidroliza con 50 ml de H₂SO₄ N durante 30 min a 121° C. Luego de enfriar, se agrega 2 ml de acetato de sodio 2,5 M y se ajusta a pH 4.5 con NaOH N. El extracto se lleva a volumen (200 ml) y se filtra. Una alícuota (20 ml) se lleva a pH 6.8 con NaOH y se completa un volumen de 100 ml, que será la solución a analizar (se filtra si la solución no está clara).

Solución madre de Niacina. 50 mg de ácido nicotínico U.S.P. previamente desecado sobre P₂O₅ y en la obscuridad se disuelven en etanol y se afora a 500 ml (1 ml = 100 mcg); se conserva 6 meses en refrigerador.

Solución de trabajo. Se prepara fresca para cada determinación por dilución con agua, de manera de contener 0,1 mcg/ml.

Cultivo Stock. En 3 o más tubos se preparan cultivos, usando cultivo puro de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, conocido antes como *Lactobacillus arabinosus* 17-5, e incubando a 37° C por 16-24 horas; se conserva al refrigerador.

Medio de inoculum enriquecido. El medio Difco o el sintético deberá ser enriquecido con niacina. Para ello se diluye 1 ml de la solución madre a 500 ml con agua destilada. Se mezclan 5 ml de esta solución con 5 ml de medio y se esteriliza por 15 minutos a 121° C. Es estable por 10 días en refrigeración.

Inoculum. Dos días antes de la determinación, se transfiere del Cultivo Stock de *L. plantarum* a un tubo estéril que contenga 10 ml del medio de inoculum enriquecido y se incuba a 37° C por 16-24 horas.

Preparación de la escala tipo. Esta debe prepararse, en forma simultánea, con la serie problema, de la manera siguiente y en triplicado; en una serie de tubos se colocan:

Solución tipo: 0,0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 ml
agua: 5,0 - 4,5 - 4,0 - 3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,5 - 1,0 - 0,5 - 0,0 ml al
Medio basal: (preparado según indicación del medio Difco): 5 ml a todo los tubos.

Preparación de las series problemas. Se prepara en triplicado y a cuatro niveles de concentración.

solución problema: 1,0 - 2,0 - **3,0** - 4,0 ml
agua: **4,0 - 3,0 - 2,0 - 1,0** ml
medio basal : 5 ml a todos los tubos

Luego de taponar y esterilizar a 121° C durante 8 min se incuba con el *Lactobacillus plantarum* que se desarrolló en el medio de inoculum.

Se ha observado que no es necesario lavar el inoculum con solución salina estéril, ya que la cantidad de niacina que se transfiere a los tubos, cuando se inocula, no excede de 5×10^{-9} g por gota.

Los tubos se colocan en estufa a 37° C (aprox. 0.5°) por 72 horas, titulándose la acidez desarrollada por acidimetría con NaOH aprox. 0,1 N, usando azul de bromotimol como indicador (1°/o en alcohol de 50°). También puede emplearse un titrímtero (Fisher) ajustando el pH a 7.0.

CALCULOS

La curva tipo se prepara, colocando en un sistema de coordenadas el promedio de los valores de la titulación, encontrados a cada nivel de niacina tipo, contra las concentraciones correspondientes.

Los valores obtenidos para las muestras se interpolan en la curva. Los resultados finales, se promedian y aquéllos que varían en aprox. 10°/o de este valor se eliminan, calculándose un nuevo promedio.

DETERMINACION MICROBIOLOGICA DE RIBOFLAVINA^{4, 11}

El método tiene el mismo fundamento que el de la determinación de Niacina, descrito anteriormente, usando como cepa el *Lactobacillus casei*.

Preparación de la muestra. Se pesa una cantidad tal de muestra que, diluida con una cantidad de 10 veces su peso en sustancia seca con HCl 0,1 N, contenga unos 0,1 mg/ml de riboflavina. Se ajusta, en caso necesario, a pH 5-6 con HCl diluido, se suspende por agitación y se autoclava a 121-123° C, durante 30 min. Después de enfriar se agrega 2 ml de acetato de sodio 2,5 M, se ajusta el pH a 4,5 y se entera a volumen con agua destilada, filtrándose en caso necesario.

Una alícuota se lleva a pH 6,8 con NaOH N y se completa a un volumen, de modo que la solución a analizar contenga aproximadamente 0,05 mcg/ml de riboflavina (= solución de la muestra:).

En muestras con mucha materia grasa, hay que desgrasarlas previamente con éter (11).

Solución madre de riboflavina. 25 mg se disuelven en 250 ml de ácido acético 0,02 N (1,2 ml de ácido acético glacial en 1000 ml de agua). Se completa a 1000 con agua de manera que la solución final contenga 25 mcg/ml. (Es conveniente mantener la riboflavina en sustancia por 24 horas en desecador de pentóxido de fósforo).

Solución de trabajo. Se diluye 1 ml de la solución madre a 250 ml con agua destilada, de manera que su concentración es 0,1 mcg/ml. Se mantiene en refrigerador y se debe renovar cada 5 días.

Cultivo Stock. En tres o más tubos, se preparan cultivos, a partir de un cultivo puro de *Lactobacillus casei* ATCC 9595, e incubando a 37° C por 16 a 24 horas; se conserva en refrigerador.

Medio Inoculum enriquecido. El medio basal sintético ** o de Difco, deberá ser enriquecido con riboflavina. Para ello se agrega a dos tubos que contienen 5 ml de medio basal, 5 ml de una solución de riboflavina que contiene 1 mcg/ml (1 ml de la solución madre se lleva a 25 ml con agua). Los tubos, tapados con algodón cardé, se esterilizan a 110° C, por 30 min. Debe evitarse la exposición de los tubos a la luz, luego de haberse agregado la riboflavina.

Inoculum. Dos días antes de la determinación se hace un trasvase de cultivo Stock a un tubo estéril que contiene los 10 ml de medio Inoculum enriquecido y se incuba a 37° C por 16 a 24 horas.

Reparación de la escala tipo. Debe prepararse en forma simultánea con la serie de la muestra, en triplicado y en la siguiente manera:

Solución tipo : 0,0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 - **3,0** - 4,0 - **5,0 ml**
Agua : **5,0 - 4,5 - 4,0 - 3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,0 - 0,0 ml**
Medio basal : (preparado según indicaciones de Difco) : 5 ml a todos los tubos;

Preparación de las seriesproblemas. Se prepara en triplicado y a cuatro niveles de concentración:

Solución problema	: 1,0 -2,0 -3,0 -4,0 ml
Agua	: 4,0 -3,0 -2,0 -1,0 ml
Medio basal	: 5,0 ml a todos los tubos.

Los tubos taponados, se esterilizan a 121° C durante 10 min. Se enfrían rápidamente y se adiciona en forma aséptica a cada tubo, una gota de Inoculum.

Se incuba a 37° C durante 72 horas; la temperatura de incubación no debe variar en más de 0,5° C.

Se titula la acidez desarrollada en cada tubo con NaOH 0,1 N, usando como indicador el azul de bromotimol (al 1°/o en alcohol de 50°); o bien electrométicamente a pH 6,8.

Cálculos. Como se describe para la valoración microbiológica de Niacina.

REFERENCIAS

1. WILLIAMS, LOUIS O.: Técnica indicada en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
2. PARRISH, D. B.: History and future of the A.O.A.C. - Chemical Method for Vitamin A. *Journ. of A.O.A.C.* **49**, 1066-1071 (1966).
3. STROHECKER, ROLF NAD HENNING, HEINS M.: Vitamin Assay, Tested Methods. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, Editor: E. Merck, Darmstadt (1965).
- 3a. STROHECKER, ROLF NAD HENNING, HEINS M.: Traducción al español por F. Mayor. Editorial Paz Montalvo, Madrid (1967).
4. A.O.A.C.: Official methods of analysis of the Asso. of Official Anal. Chemists. William Horvits, Editor, XI Ed. Washington (1970).
5. MARINI-BETTOLO G. B.: Le Reazioni Organiche. Sansoni Edizione Scientifiche. Firenze (1951).
6. MORTON, R. E. and STUBBS, A. L.: *Analyst* **71**, 348-356 (1946); *Journ. Biochemistry* **41** 525 (1947) y **42**, 195 (1948).
7. SCHORMULLER, J.: *Handbuch der Lebensmittelchemie*. Tomo II. Parte 2. Springer Verlag, Berlin (1967).
8. SCHMIDT-HEBBEL, H. y colaboradores: Métodos de valoración de vitaminas en alimentos. Santiago, Editorial Universitaria, Santiago, Chile (1958) agotado.
9. ROE J. H. et al.: *J. Biol. Chem.* **147**, 399 (1943) y **153**, 511 (1944).
10. SCHMIDT-HEBBEL, H.: *Curso de Análise Química de Alimentos*, Instituto de Tecnología de Alimentos, Campinas, Brasil (1970).
11. BARTON-WRIGTH, E. C.: *The Microbiological Assay of the Vitamin-Complex and Amino Acids*. Sir Isaac Pitman and Sons, London (1952).
12. SCHMIDT-HEBBEL, H.: *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Editorial Universitaria, Santiago, Chile (1973).

Esta publicación ha sido posible gracias a la comprensión y gentileza del Sr. Fernando Valenzuela Erazo, Vicerrector de Extensión y Comunicaciones de la Universidad de Chile.