

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" ESTUDIO COMPARATIVO DE 3 METODOS PARA DETERMI-  
NACION DE SULFITOS EN VEGETALES DESHIDRATADOS "

OSCAR ROBERTO DIARTE CHAIDEZ

INGENIERO QUIMICO

1975



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESIDENTE :           PROFA. NINFA GUERRERO DE CALLEJAS  
VOCAL :                 PROF. ENRIQUE GARCIA GALEANO  
SECRETARIO :           PROFA. ANGELA SOTELO LOPEZ  
PRIMER SUPLENTE :     PROF. EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ  
SEGUNDO SUPLENTE :   PROF. ALEJANDRO GARDUÑO TORRES

OSCAR ROBERTO DIARTE CHAIDEZ  
Sustentante

PROF. ENRIQUE GARCIA GALEANO  
Asesor

CON RESPETO :

A los directivos de Productos Deshidratados de México, S. A.  
en agradecimiento a las facilidades proporcionadas para la realización  
de esta Tesis.

CON ESTIMACION :

A mis compañeros de trabajo en especial al Dr. Javier Loustaunau

CON CARÍÑO :

A mis Padres y Hermanos.

## I N D I C E .

Capítulo I : INTRODUCCION .....Pág. 7

Capítulo II : GENERALIDADES .....Pág. 10

Capítulo III : MATERIALES Y METODOS.....Pág. 23

Capítulo IV : PARTE EXPERIMENTAL .....Pág. 36

Capítulo V : RESULTADOS.....Pág. 40

Capítulo VI : CONCLUSIONES.....Pág. 50

Capítulo VII : BIBLIOGRAFIA.....Pág. 54

I N T R O D U C C I O N

Dentro de la tecnología de deshidratación de alimentos se ha visto la conveniencia de usar productos químicos que se conocen con el nombre de aditivos; para conservar las propiedades nutritivas de los alimentos que se pueden ver alterados durante el proceso de deshidratación o durante su almacenamiento, así mismo, contribuyendo a mejorar el aspecto final del producto.

Dentro de los aditivos que se han usado desde hace varios siglos-esta el dióxido de azufre.

La práctica de sulfitar alimentos es muy antiguo. El exponer fruta cortada a los humos de azufre se conoce desde el siglo pasado (27).

El agregar dióxido de azufre a fermentaciones del jugo de uva ha sido practicado desde hace 500 años (8).

Estas técnicas han variado desde casas de azufre donde el producto almacenado es expuesto a los gases de combustión de azufre, a sulfitos contínuos ya sea por inmersión ó aspergado con soluciones de sulfitos.

Cada país tiene normas en cuanto a niveles de sulfitos para cada producto determinado, las que varían de 0 a 3000 ppm.

Así mismo las empresas tienen sus especificaciones para niveles de sulfito los cuales se encuentran dentro de las de su país.

En la literatura se reportan más de una decena de métodos de análisis, pero no hay uno universalmente aceptado.

Hoy en día control de calidad e inspección para compras es mucho más estricto lo que ha hecho necesario el disponer de métodos analíticos confiables para la creciente industria de vegetales deshidratados.

El objeto de este estudio es el de comparar 3 métodos para determinar sulfitos que representan los principios comunes y aceptados en la metodología analítica y así comparar su comportamiento con distintos vegetales deshidratados.

GENERALIDADES

\_Q\_U\_I\_M\_I\_C\_A\_ . -

El dióxido de azufre es un gas incoloro e inflamable de olor sofocante, se licua a 10° C. y es obtenido de la combustión del azufre, también se puede obtener a partir de las sales de potasio y de sodio del ácido sulfuroso, estas son las fuentes más usadas actualmente por la industria alimentaria para la obtención de dióxido de azufre. La disponibilidad de SO<sub>2</sub> real es menor que la teoría como lo muestra la tabla 1, el porcentaje de disponibilidad disminuye con el tiempo debido a su oxidación durante el almacenamiento (9).

TABLA 1 -

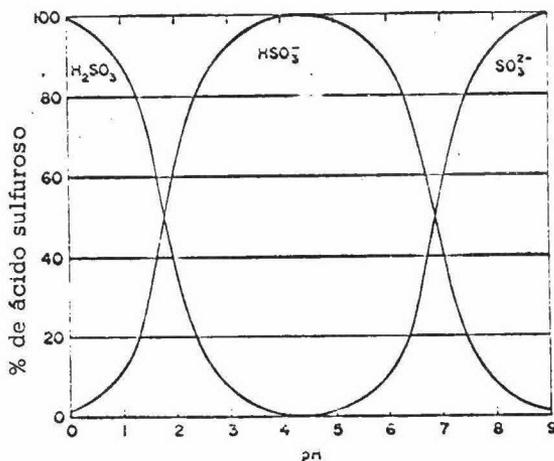
Disponibilidad del dióxido de azufre en varios compuestos sulfurados. (14)

<u>COMPUESTO</u>	<u>FORMULA</u>	<u>% DISPONIBLE DE SO<sub>2</sub></u>	
		<u>TEORICO</u>	<u>REAL</u>
Dióxido de Azufre Líquido	SO <sub>2</sub>	100.0	100.0
Acido Sulfuroso, 6%	H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	6.0	6.4 - 6.8
Sulfito de Calcio	CaSO <sub>3</sub> , 1½ H <sub>2</sub> O	23.0	43.45
Sulfito de Potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	33.0	36
Sulfito de Sodio	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	50.84	-----
Bisulfito de Potasio	KH SO <sub>3</sub>	53.31	-----
Bisulfito de Sodio	Na. HSO <sub>3</sub>	61.59	55
Meta Bisulfito de Potasio	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	67.43	52
Meta Bisulfito de Sodio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	57.65	61

Estas sales en soluciones acuosas forman directamente ácido sulfuroso ( $H_2SO_3$ ) ion bisulfito ( $HSO_3^-$ ) y ion sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) la relativa proporción de c/u de estas formas dependen del pH de la solución (9). Como se ve en la gráfica 1.

GRAFICA 1.

Distribución de las diferentes formas de ácido sulfuroso a varios pH. (14)



El dióxido de azufre ha sido por años como el más viable preservador en alimentos, pues inhibe el crecimiento de bacterias hongos y levaduras, tiene también la ventaja que es un agente reductor y ayuda a la conservación de nutrientes como en el caso del ácido ascórbico que es fácilmente oxidado y es además un agente "blanqueador" (desactivador de enzimas) que previene el desarrollo del color oscuro debido a la acción enzimática. (8)

La mayor efectividad antimicrobiana y de agente reductor de los sulfitos se da a pH bajos, ya que son las condiciones en que el ácido sulfuroso esta menos disociado. (9) (4)

#### ACCION ANTIMICROBIANA

Rehm and Wittman obtuvieron evidencias que el ácido no disociado es 1000 veces más activo como inhibidor de crecimiento que el  $\text{HSO}_3^-$  para la *E. coli*, 100-500 veces más para *S. cerevisiae* y 100 veces más para *A. Niger* (9).

De acuerdo con ellos la mayoría de las bacterias son inhibidas -- con 200 ppm. La mayoría de las levaduras son también inhibidas por 200 ppm con algunas excepciones. La mayoría de los hongos fueron susceptibles a 200 ppm pero con notables excepciones. (9)

Cruesse encontró que a un pH de 3.5 se necesitan de 2 a 4 veces más de  $\text{SO}_2$  para inhibir el crecimiento que a un pH de 2.5 A pH de 7 el dióxido de azufre pierde su efectividad para hongos y levaduras. (9)

La efectividad aumentada a bajo pH puede ser el resultado de la más alta penetración de la membrana celular por el ácido sulfuroso no ionizado. (9). El efecto inhibidor del dióxido de azufre (ácido sulfuroso o cualquiera de sus formas) puede deberse a su reacción con el grupo carbonilo de los carbohidratos evitando su utilización como fuente de energía (18).

Rehm también ha reportado estudios cuantitativos de las relaciones entre la formación de compuestos de adición al grupo carbonilo y la actividad antimicrobiana del ácido sulfuroso en *S. cerevisiae* y *E. coli*. (9) (18)

De estos trabajos concluyen que en los mecanismos de respiración los pasos que envuelven a la nicotinamida dinucleotido (NAD) son inhibidos como resultados de la formación de ciertos hidroxisulfanatos formados por combinación de  $SO_2$  con grupos cetonas. (9) (18).

#### ACCION INHIBIDORA DE ENZIMAS.

Muchos compuestos químicos son efectivos inhibidores de la actividad de la polifenol oxidasa (fenolasa), pero el dióxido de azufre es indudablemente el más usado y el más efectivo. (23).

Wyss encontró que el ácido sulfuroso puede bloquear enzimas debido a la reducción de las uniones S-S de las proteínas de las enzimas. (9) (18).

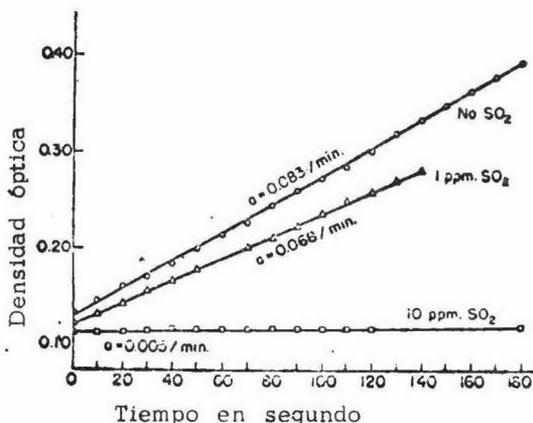
En las piezas de frutas la profundidad y el grado de penetración es importante, ya que la cantidad de  $SO_2$  alcanzada en el centro deberá ser adecuada para inactivar las enzimas, pero no en exceso que cause daño en sabor. (23). El dióxido de azufre reacciona con aldehidos y cetonas especialmente con glucosa para formar productos de adición que une al  $SO_2$  más ó menos estrechamente dependiendo del tipo de aldehidos, cetonas, pH, etc. (23). La relativa efectividad del  $SO_2$  libre y el  $SO_2$  combinado en la inhibición de la polifenol oxidasa no ha podido ser establecida a pesar de que se han hecho varios trabajos; Kerp 1904, Bioletti and ----- Cruess 1912, Muller-Thurgau y Asterwalder 1914, Rahn and Conn 1947, - Ingraham 1948 y Yang and Wiegand 1951. Ellos encontraron que en casos análogos la prevención fermentativa del jugo de frutas es debido solo al  $SO_2$  libre (23).

Una complicación adicional que encontró Ponting and Johnson era la que parte de  $\text{SO}_2$  es oxidado en presencia de polifenol oxidasa al mismo tiempo que la enzima era inhibida (23). Esto resaltó la pregunta de que si el  $\text{SO}_2$  usado en la fruta era parcialmente oxidado por la enzima.

En recientes experimentos (Ponting 1959) mostró que esta oxidación es debida a la formación de quinona por una oxidación enzimática -- que ocurre antes de que  $\text{SO}_2$  alcance a la polifenol oxidasa (23). La enzima es extremadamente sensible al  $\text{SO}_2$  cuando los dos son llevados juntos antes de que ocurra la oxidación enzimática (23). Resultados de este experimento están en la gráfica dos.

GRAFICA 2.

Efecto del dióxido de azufre en la actividad de la polifenol oxidasa. (23)



Los cambios en oscurecimiento son medidos en función de diferentes concentraciones de  $\text{SO}_2$  cuando son agregados a cantidades mezcladas de soluciones de guayacol "regulado", e igual cantidad de parcialmente purificada polifenol oxidasa fueron agregadas posteriormente. Las líneas son una medida de la actividad enzimática que se muestra como los cambios en absorvancia ó densidad óptica por minuto. Justo a 1 ppm de  $\text{SO}_2$  causo una caída significativa de aproximadamente 20% en la actividad de la polifenol oxidasa. 10 ppm inactivo la enzima casi completamente (23). Esto se aproxima a la concentración que Downer encontró necesaria para prevenir el crecimiento de microorganismos (23).

Esto es análogo a la prevención de la fermentación con  $\text{SO}_2$ . Downer encontró que alrededor de 10 ppm de  $\text{SO}_2$  podría prevenir la fermentación pero una vez iniciada ni una gran cantidad de  $\text{SO}_2$  podría pararla, esto es debido a la producción de acetaldehído que reacciona con el  $\text{SO}_2$  adicionado como la Quinona del experimento anterior (23).

En la presencia del ácido ascórbico en lugar de la reacción directa de  $\text{SO}_2$  con ácido ascórbico ocurre un tipo de oxidación indirecta, y hay mucho menos efecto de inhibición de la enzima. De hecho como Ingraham lo demostró no hay inhibición directa sino una pérdida gradual de actividad. (23).

La penetración de  $\text{SO}_2$  es importante en la prevención del oscurecimiento especialmente si los tejidos contienen mucho oxígeno (23).

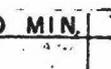
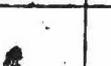
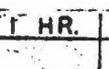
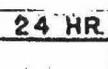
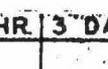
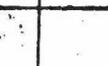
La figura 1 muestra la tabla recopilada en una prueba con Guayacol; los grados de penetración de ácido sulfuroso y bisulfito de so

dio en manzana. En el caso del ácido sulfuroso, la penetración es completa en 20 minutos a 20° F. (23).

FIGURA 1.

Exámen de Guayacol en segmento de manzana tratada con dióxido de azufre.

(23).

		20 MIN.	1 HR.	24 HR.	3 DAYS
SULFUROUS ACID	20° F.				
	-10° F.				
SODIUM BISULFITE	20° F.				
	-10° F.				

\_U\_S\_O\_S\_.

FRUTAS :

El dióxido de azufre es el más usado agente en la prevención de las reacciones de oscurecimiento en frutas secas, no es sólo capaz de inhibir la reacción enzimática, sino también de oscurecimiento no enzimático conocido como la reacción de Maillard (4).

La fruta madura absorbe más despacion el dióxido de azufre que la fruta no madura, y conserva mejor los sulfitos durante y después del secado (4). La vida de almacenamiento de frutassecas es en muchos casos directamente proporcional al nivel del dióxido de azufre inicial (4).

En algunas frutas como la manzana es muy importante que la penetración sea correcta ( se recomienda que el sulfitado sea por inmersión y por un tiempo determinado ), pues sus tejidos contienen mucho oxígeno, para otras frutas como el durazno que no tiene oxígeno en sus tejidos no es necesaria la inmersión, el sulfitado aspergado es suficiente (23).

VEGETALES :

Para los vegetales una mezcla de sulfito neutral y bisulfito es ordinariamente usada para su sulfitado. La solución es aspergadamente aplicada durante y después del "blanqueo" y antes de la deshidratación (9). La aplicación de dióxido de azufre ó sulfitos a vegetales que van a deshidratarse incrementa la vida del almacenamiento, preserva el color y sabor y ayuda a la retención de ácido ascórbico y carotenos (9), (4).

Si en el uso final de estos productos tratados con dióxido de azufre y sulfito es que van a ser enlatados, el sulfito deberá reducirse a menos de 20 ppm., pues de otra manera el  $SO_2$  puede reaccionar con el metal de la lata generando ácido sulfhídrico  $H_2S$  dando un precipitado blanco (9).

#### JUGOS :

Los jugos de frutas especialmente aquellos en que el pH es comparativamente bajo pueden ser preservados por el dióxido de azufre. El jugo de fresas, grosella negra y otras bayas y especialmente los jugos de los citricos pueden ser preservados por la adición de 350 a 600 ppm. (11) en caso de concentrados de citríficos que no vayan a ser congelados la cantidad de dióxido de azufre puede verse incrementada a 1000-1500 ppm (11). Esto puede ser necesitado cuando existan cantidades considerables de azúcar.

La preservación de jugos concentrados y pure por dióxido de azufre es más común en países con clima tibio y aquellos en donde la facilidad de almacenarlos en frío es limitada (9).

#### VINOS :

En la elaboración del vino, el sulfito es importante en varios de los pasos. Primero en solución es usado para limpiar el equipo (9). Antes de la fermentación el jugo de fruta deberá ser tratado con dióxido de azufre para eliminar la flora microbiana natural asociada con la fruta (9). Los cultivos puros de las levaduras deseadas para la elaboración del vino son enton

ces agregados para que se lleven a cabo la fermentación alcohólica y otras reacciones importantes para conseguir el sabor y aroma deseados (9). Durante el paso de la fermentación 50-100 ppm de  $SO_2$  son usualmente efectivos como antioxidante, clarificador y agente disolvente (9). En el tanque de almacenamiento de vino después de la fermentación un nivel de 50-75 ppm. es mantenido para prevenir cambios post fermentativos causados por microorganismos (9).

#### NORMAS DE APLICACION :

Todas las sales de sulfito y dióxido de azufre son generalmente reconocidas como disponibles para su uso en alimentos por la U.S. Food & Drug Administration. Hay sin embargo una condición que no pueden ser utilizadas en alimentos que son fuente de tiamina (vitamina  $B_2$ ), pues esta es destruída por dióxido de azufre (9).

El uso de carne y pescado también es prohibido. A la carne le imprime un color y apariencia de frecura como resultado de la reacción con la hemoglobina, (9). Con esta forma SO-hemoglobina compuesto que es rojo y comparable en apariencia a la oxi-hemoglobina de la carne fresca (25).

En Inglaterra los sulfitos son permitidos en Salchichas y en carne y en Francia en camarones y pescado fresco. Presumiblemente un propósito de adicionar sulfitos a estos productos es controlar la deterioración por procesos oxidativos (9).

El uso de sulfitos es limitado por el hecho de que a niveles residuales arriba de 500 ppm el sentido del gusto comienza a notarlo (9). Las --

cantidades ingeridas son mucho más bajas que las inicialmente adicionadas a alimentos por pérdidas durante su almacenamiento y durante su cocinado (9). En 6 meses de almacenamiento una tercera parte ó la mitad de la cantidad original de dióxido de azufre es gradualmente perdido (25).

Metabólicamente el dióxido de azufre y sulfito en el cuerpo son oxidados a sulfato y excretado en la orina (9).

#### DISULFITADO :

Varios métodos han sido desarrollados para eliminar sulfitos y dióxido de azufre. Los factores que influyen en el desulfitado son temperatura, pH, contenido de azúcar y cantidad total de ácido sulfuroso, pero parte del dióxido de azufre es oxidado y permanece como sulfato (4).

La desulfitación inevitablemente resulta en pérdida de sabor (4).

Los métodos son enumerados aquí en orden de menor a mayor eficacia para desulfitar (4) :

- 1) Centrifugación
- 2) Vacío
- 3) Agitación
- 4) Calentamiento (140 F)
- 5) Inyección de aire
- 6) Inyección de aire y calentamiento
- 7) Agitación y calentamiento
- 8) Vacío e Inyección de aire
- 9) Vacío y calentamiento
- 10) Vacío, inyección de vapor de agua y calentamiento
- 11) Vacío, inyección de aire y calentamiento

En jugos el método de Vacío, inyección de aire y calentamiento ha  
ce posible eliminar del 80 a 90 % de dióxido de azufre ( 4 ).

MATERIALES Y METODOS

## METODOS PARA DETERMINAR EL SO<sub>2</sub>.

La mayoría de los métodos que han sido propuestos para la determinación cuantitativa de dióxido de azufre en alimentos quedan envueltos en estas tres técnicas de análisis (15).

- a) Volumétrico.
- b) Gravimétrico.
- c) Colormétrico.

a) El análisis volumétrico consiste en una absorción que se lleva a cabo por un agente oxidante como el yodo, bromo, peróxido de hidrógeno. Los cuales convierten el ácido sulfuroso en ácido sulfúrico reduciéndose el yodo a yoduro. (2), (21). Todo esto en presencia de almidón como indicador.

La acción del yodo sobre almidón constituye un ensayo distintivo y muy sensible de este elemento (2). Añadiendo indicios de yodo del orden de una milésima de gramo a una emulsión de almidón esta toma un color -- azul muy intenso (2). La sustancia coloreada que se forma no es un compuesto químico definido (2). El color procede de las moléculas de yodo absorbidas en la superficie del almidón (2). Así que mientras exista ácido sulfuroso en la solución que se está titulando, el yodo estará oxidándolo y convirtiéndolo en ácido sulfúrico. La titulación terminará cuando el yodo al no reducirse formará el complejo yodo-almidón de color azul intenso indicando que todo el ácido sulfuroso a sido oxidado a sulfúrico.

Y luego con la ecuación 1 podrá calcularse las ppm de dióxido de azufre presentes.

$$\text{ppm} = \frac{V_1 \times N_1 \times \text{Eq. SO}_2}{\text{Peso muestra}} \times 1000 \quad \text{Eq. 1}$$

$V_1$  = Volúmen de yodo gastado

$N_1$  = Normalidad del yodo usado ( Se recomienda checar la normalidad del yodo cada vez que se va a utilizar ).

Eq.  $\text{SO}_2$  = Equivalente químico del dióxido de azufre = 32.

A su vez el yodo ha sido titulado con una solución de tiosulfato sodico pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). 1N. para encontrar su normalidad su utilizan la ecuación 2.

$$N_1 = \frac{N_T V_T}{V_1} \quad \text{Eq. 2}$$

$N_T$  : Normalidad del tiosulfato sódico, el cual es considerado en algunas ocasiones como estandar primario y si no estandarizado con dicromato de potasio (1).

$V_T$  : Volúmen del tiosulfato llevado a titulación.

$V_1$  : Volúmen de yodo gastado.

Se puso el ejemplo del yodo porque es el agente más usado para este tipo de determinación. Pero puede usarse como anteriormente se dijo otros agentes oxidantes utilizando los mismos principios.

1 ml. de solución de bromo .05N = 1.60 mg. de  $\text{SO}_2$  (20).

En el caso del peróxido de hidrógeno el dióxido de azufre reacciona con el para formar ácido sulfúrico y después la acidez producida es titulada con hidróxido de sodio .1 N. NaOH utilizando azul de bromo fenol como indicador.

Este método es preferible a la titulación con yodo cuando se encuentran presentes compuestos de azufre volátiles (pues el yodo reacciona con ellos) como el caso de la mostaza, cebolla y rabano.

Este método evita la sobreestimación de dióxido de azufre presente que se pudiera tener al titular con yodo.

b) Gravimétrico.

El dióxido de azufre presenta después de haber sido transformado en ácido sulfúrico por un agente oxidante, es precipitado con una solución de cloruro de bario.



Se deja reaccionar durante toda la noche en medio ácido

El sulfato de bario formado es filtrado y lavado con agua caliente, alcohol y éter y después secado hasta peso constante a 105 - 110 C. Para calcular su equivalencia en ppm. de SO<sub>2</sub> se utiliza la ecuación 3.

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg BaSO}_4 \times 274.46}{\text{Peso muestra}} \quad \text{Eq. 3}$$

c) Colormétrico.

El SO<sub>2</sub> es liberado de los alimentos por un ácido fuerte en la presencia de tetramercurato de sodio, el cual lo ata débilmente y permite la formación de un ácido sulfúrico de color púrpura con ácido-pararosamilina y formaldehído. La absorvancia de este compuesto púrpura es medido a 550 mm.

Todos estos métodos miden el SO<sub>2</sub> total es decir el SO<sub>2</sub> libre más el SO<sub>2</sub> combinado. Es el SO<sub>2</sub> total es el que toman en cuenta para las regulaciones.

## METODOS PARA REMOVER EL SO<sub>2</sub>.

Todos estos métodos de determinación parten del ácido sulfuroso. La manera en que el dióxido de azufre es removido de los alimentos es generalmente de 2 maneras.

a) Destilación

b) Digestión

A) Destilación del dióxido de azufre en presencia de ácido por un corriente de gas ó vapor que burbujea dentro del matraz con la muestra y SO<sub>2</sub> es arrastrado.

El gas es nitrógeno el cuál a su vez a sido burbujeado en una solución de pyragallol alcalina para quitar cualquier traza de oxígeno presente el nitrógeno.

El gas puede ser sustituido por una corriente de vapor procedente de un matraz que contiene agua en ebullición constante.

B) Digestión: El dióxido de azufre presente en un alimento es dejado en libertad por un proceso de digestión, poniéndolo en contacto con una solución fuertemente alcalina. Luego acidificando la solución el dióxido de azufre pasaría a ácido sulfuroso.

Uno de los métodos más aceptados para la determinación de dióxido de azufre es el propuesto por Monier-Williams (1), (20), (13), (17).

En el cual el dióxido de azufre es removido por destilación con corriente de nitrógeno y recogido en solución de peróxido de hidrógeno al 3%. A veces que esta el dióxido de azufre como ácido sulfúrico hay dos caminos: la determinación de acidez con hidróxido de sodio ó la precipitación con sulfato de bario o sea por el método gravimétrico.

Este método a sido modificado en muchas ocaciones, Cada una -- de las modificaciones aceptadas estan basadas en estudios comparativos-- entre Monier-Williams y el método modificado.

Uno de los métodos que se utilizó en este estudio (el que llamare mos por destilación) es una modificación al original Monier-Williams que - fué publicado en un reporte de determinación de preservativos por el comi- te of the chemists of the Manufacturing Confectioners' Alliance and the -- FMF (Analyst, Lond., 1928, 53, 118), el cual es aplicable a la gran mayo ría de alimentos. (17) (20).

Otro método utilizado en este estudio es el método colorimétrico - oficial del AOAC, pero solo para frutas deshidratadas (1). Y en esta oca sión trataremos de ver como se comporta en vegetales deshidratados. En - este método (al que llamaremos colorimétrico) el dióxido de azufre es remo vido por una solución alcalina y después acidificado, luego es tratado con tetramercurato y posteriormente con sal de para-rosanilina y formaldehído para la formación del color (1).

Y el último de los métodos es un estudio realizado por Potter y es- una titulación directa con yodo. Potter lo tomó de un método descrito para vinos (C.F. Jensen H.R. Analyst. Lond. 1928, 53, 133) y lo adaptado pa ra vegetales deshidratados (19).

En este método (al que llamaremos titulación directa), la muestra- es puesta por duplicado. En ambas muestras el  $SO_2$  es removido por alcali y luego acidificado, únicamente la diferencia es que a uno de los dupli cados se le agrega peroxido de hidrógeno al 3%. Se titulan directamente

con soluciones de yodo.

El primero de los duplicados nos da la cantidad de yodo usado para pasar de ácido sulfuroso a sulfúrico más el yodo que reaccionó con la materia orgánica.

En el segundo o sea al que se le agrega peróxido de hidrógeno antes de la titulación nos da la cantidad de yodo que reacciona con la materia orgánica. Pues el ácido sulfuroso ya fue oxidado por el peróxido de hidrógeno.

Así pues la diferencia del primero menos el segundo nos daría la cantidad de yodo en la oxidación del ácido sulfuroso pudiendo utilizar la ecuación 4 para el cálculo de  $\text{SO}_2$  en ppm :

$$\text{ppm} = \frac{\text{Diferencia en ml.} \times N_1 \times \text{Eq. SO}_2}{\text{Peso muestra}} \times 1000 \quad \text{Eq. 4}$$

Las enunciadas de los métodos utilizados en este estudio se encuentran en las páginas siguientes.

METODO DESTILACION  
=====

PREPARACION DE REACTIVOS:

Solución de Almidón 1% : 10 gramos de almidón son disueltos en -  
100 ml. de agua caliente. Una vez disuelto, aforar a 1 lit.

Solución de Yodo. 02 N. : Adicionar 2.54 gramos de yodo a 5 gra-  
mos de yoduro de potasio, el cual ha sido disuelto en la menor can-  
tidad de agua posible. Afórar 1000 ml. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO :

- 1) Llevar 250 ml. de agua destilada a ebullición en un matraz
- 2) Pese exactamente 8 gramos de muestra y pásela al matraz de ---  
tres bocas.
- 3) Conecte una boca al condensador con agua corriente.
- 4) Conecte otra boca al matraz generador de vapor, pero no permita  
que el vapor pase al matraz de 3 bocas.
- 5) En un vaso de 300 ml. ponga 150 ml. de H<sub>2</sub>O destilada, unos po-  
cos de cristales de yoduro de potasio, 1, ml. de solución de al-  
midón y 3-4 gotas, de solución de yodo. 02 N, para desarrollar-  
color azul. Pongá todo esto encima de un agitador magnético. -  
La boca del condensador debe quedar sumergida en esta solución.
- 6) Adicione 20 ml. de ácido clorhídrico (despacio) a 250 ml. de ---  
agua destilada caliente y adiciónelos al matraz de 3 bocas. Tape  
el matraz inmediatamente.
- 7) Lea la lectura de la bureta y anótela.

- 8) Abra la conexión entre el generador del vapor y el matraz y cierre el escape de vapor para que burbujee en el matraz.
- 9) La solución de color azul empezara a perder color. Mantener el color azul mediante la adición de solución de yodo.
- 10) El fin de la determinación es cuando el color azul de vaso se mantiene durante un minuto.

CALCULOS:

$$\text{ppm} = \frac{V_1 \times N_1 \times E_q \times 1,000,}{\text{Peso muestra}}$$

$$\text{ppm} = \frac{V_1 \times N_1 \times 32,000}{8} = V \times N \times 4,000$$

METODO COLORIMETRICO

DE REACTIVOS :

5n de Hidróxido de Sodio : .5N, se pesan 20 gr. de Na OH y se disuelven en 1 Lt. de agua destilada.

5n de Acido Sulfúrico : .5N, diluir 13.3 ml. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 Lt. de agua destilada, agregar lentamente.

5n de Rosanilina : (Indicador) : Disolver .1 gr. de Rosanilina en 100 ml. de agua destilada, agregar 160 ml. de Acido Clorhídrico 1 + 1 y diluir a volumen de 1 Lt., dejar reposar 12 horas este reactivo antes de usarse.

5n de Formaldehído : .015% : Diluir 11 ml. de Formaldehído en 1 Lt., tomar una alícuota de 28 ml. y llevarla a 1 Lt.

DE LA CURVA ESTANDAR :

Preparar 170 mg. de Bisulfito de Sodio NaHSO<sub>3</sub> en 1 Lt. de agua. Estándarizar con solución de yodo .01N, esta solución estándar equivale a 100 ppm. o  $\mu\text{g/ml}$ .

Adicionar 5 ml. de solución TCM a una serie de matraces volumétricos de 100 ml. que contiene 1, 2, 3, 4, etc. ml. de solución estándar de sulfitos.

Adicionar 5 ml. de cada matraz a tubo de ensayo que contenga 5 ml. de solución de Rosalina.

\* Adicionar 10 ml. de solución de formaldehído .015%.

\* Mezcle y espere 30 minutos a 22 C.

\* Lee en el espectrofotómetro a 550 mm., y trazar una curva estándar de  $\mu\text{g/ml.}$  contra D.O.

PROCEDIMIENTO :

- 1) Pesar 10 gr. de muestra y agregar 290 ml. de agua destilada.
- 2) Licuar y filtrar sobre algodón.
- 3) Trasferir 10 g. (10 ml.) a matraz de 100 ml. que contenga 4 ml. de solución de Na OH .5N agitar por 30 segundos.
- 4) Adicionar 4 ml. de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  .5N.
- 5) Agregar 20 ml. de solución de TCM y diluir a volúmen.
- 6) Trasferir 2 ml. de este matraz a tubo de ensaye conteniendo -- 5 ml. de solución de Rosanilina.
- 7) Adicionar 10 ml. de solución de Formaldehdo .015%
- 8) Mezclar y esperar 30 minutos a 22 C.
- 9) Leer en el espectrofotómetro a 550 mm.
- 10) Con la ecuación de la curva transformar de densidad óptica ---- (D.O.) a  $\mu\text{g/ml.}$  y multiplicar por 2550, que es el factor de dilu ción.

METODO TITULACION DIRECTA

PREPARACION DE REACTIVOS:

Solución de Almidón 1% : 10 grs. de almidón son disueltos en 10-ml. de agua caliente. Una vez disuelto, aforar a 1lt.

Solución de Hidróxido de Sodio : 5 N., disolver 200 grs en 1 Lt. - de agua.

Solución de Acido Clorhídrico : 5 N., agregar 205 ml. de ácido -- clorhídrico 37% a 295 ml. de agua destilada.

Solución de Yodo : 5 N., adicionar 6.35 grs. de yodo a 11 grs. de yoduro de potasio, el cual ha sido disuelto en la menor cantidad - de agua posible. Disolver, aforar a 1 Lt. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Moler 30 grs. de producto seco (100 grs. es producto fresco), - en licuadora, durante 3 minutos.
- 2) Pesar 2 muestras de 8 grs. c/u de producto seco (32 grs. es pro- ducto fresco), y llevarlas por separado a vasos precipitados de 600 ml., adicionar 400 ml. de agua destilada.
- 3) Agregar 5 ml. de hidróxido de sodio 5N a cada vaso, agitar su- vemente y ponerlo a reposar durante 20 mts.
- 4) Después de transcurrido ese tiempo, adicionar a un vaso mien- - tras se agita en el agitador magnético. 7 ml. de ácido clorhídri- co 5N y 10 ml. de solución de almidón al 1%.  
Titular inmediatamente con solución de yodo al .05 N hasta la -

formación de color azul. El color azul deberá permanecer durante 30 segundos, apuntar la cantidad de ml. usada.

- 5) Agregar al segundo vaso, mientras se agita 7 ml. de ácido clorhídrico 5 N, 10 ml. de solución de almidón al 1% y 2 ml. de peróxido de hidrógeno al 3% titular inmediatamente al azul permanente, apuntar la cantidad en ml. usada.

**CALCULOS :**

A = (ml. de solución de yodo usadas en el paso 4) - (ml. de solución de yodo usados en el paso 5).

$$\text{ppm} = \frac{A_1 \times N_1 \times \text{Eq.} \times 1,000}{\text{Peso muestra}}$$

$$= \frac{A_1 \times N_1 \times 32,000}{\text{Peso muestra}}$$

Para producto seco :

$$\text{ppm} = A_1 \times N_1 \times 4000$$

Para producto fresco :

$$\text{ppm} = A_1 \times N_1 \times 1000$$

P A R T E  
E X P E R I M E N T A L . -

Este experimento consta de analizar 3 vegetales diferentes por 3 métodos analíticos con 20 repeticiones por vegetal y analizado estadísticamente en un factorial de 3 x 3. Cada uno de los vegetales tiene un nivel de sulfitado diferente a los otros dos, y de esta manera ver el comportamiento de c/u de los métodos a 3 niveles de dióxido de azufre. Estos niveles estarían repartidos en el rango de 1000 a 3000 ppm.

Los vegetales seleccionados fueron :

b<sub>1</sub>) Pimiento Verde

b<sub>2</sub>) Ejote

b<sub>3</sub>) Apio

Las muestras fueron proporcionadas por Productos Deshidratados de México, S. A.

Los niveles de dióxido de azufre en los 3 vegetales están alrededor de:

Pimiento Verde	1000 ppm.
Ejote	2000 ppm.
Apio	3000 ppm.

Las muestras fueron de 2 kg. aproximadamente y el procedimiento de la preparación de las muestras para este estudio fue el siguiente :

- . Se molieron los 2 kgs.
- . Una vez molido se homogenizó.
- . Se separó en 3 partes, c/u de ellas fue la que se utilizó para c/u de los métodos analíticos.

Las determinaciones se hicieron simultáneas, es decir diariamente se corrieron 5 análisis por c/u de los métodos en un mismo vegetal (para evi

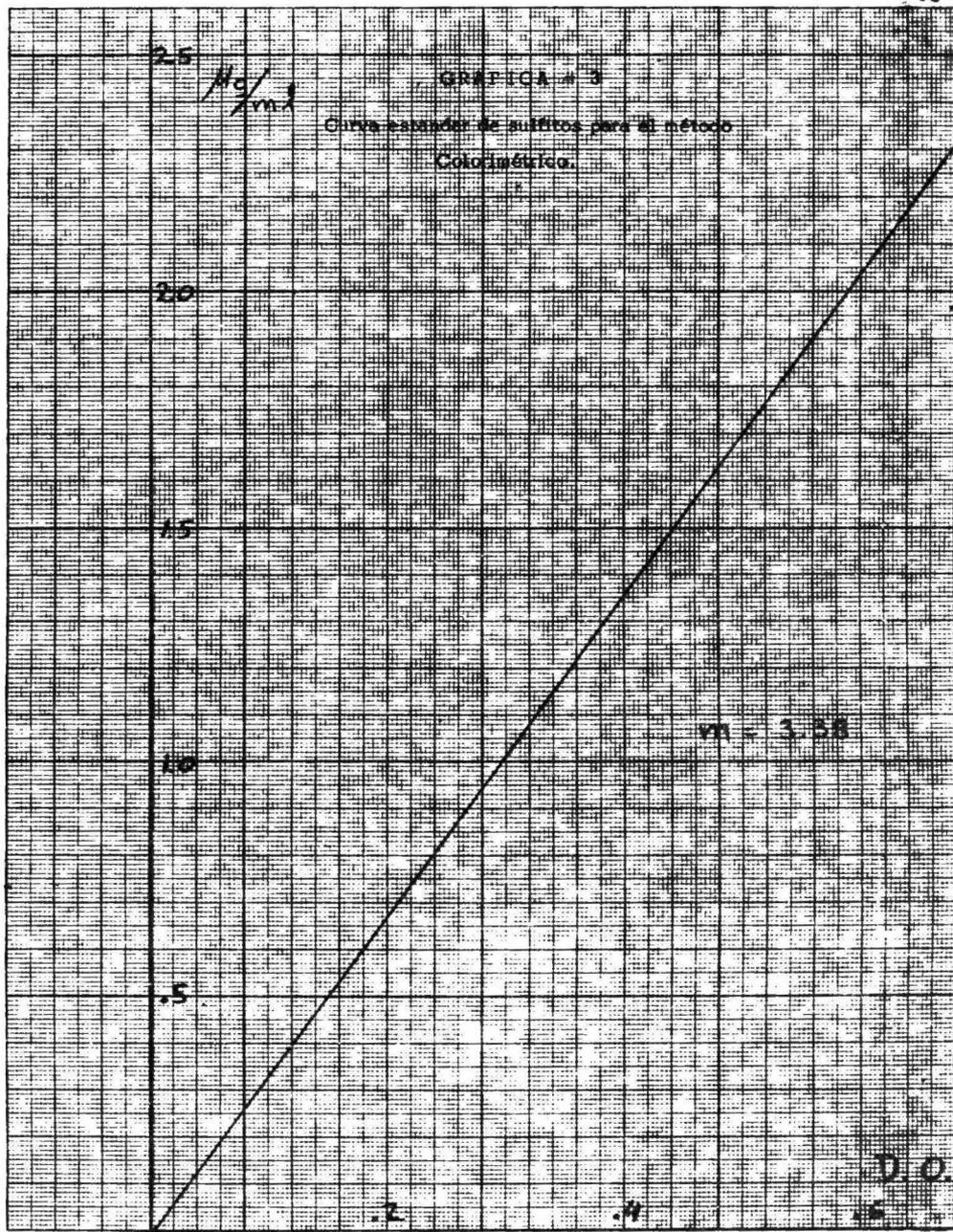
tar tomar en cuenta la variable tiempo) y así durante 4 días o sea en total 20 determinaciones de un vegetal por c/u de los 3 métodos.

Llamando al método de destilación  $a_1$  ; al método colorimétrico --  $a_2$  ; y al método de titulación directa  $a_3$  ; y a los vegetales: Pimiento Verde  $b_1$ , Ejote  $b_2$  y Apio  $b_3$ . El factorial quedaría:

$a_1$			$a_2$			$a_3$		
$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_1$	$b_2$	$b_3$
20	20	20	20	20	20	20	20	20

Para el caso del método de destilación y titulación directa, la normalidad de la solución de Yodo se checaba dos veces al día.

Para el caso del método colormétrico, se trazaron varias curvas -- estandar ( 5 en total ). Se escogio la que por su linealidad y valor de --- pendiente se encontraba cerca del promedio (ver gráfica 3).



R E S U L T A D O S

Los resultados fueron calculados tal como se explica en la parte correspondiente a cálculos de los métodos. Capítulo III

En la tabla 2, 3, 4, están reportados los resultados numéricos en ppm. de cada método para cada vegetal, así mismo su valor mínimo, su valor máximo promedio y coeficiente de variación.

El valor promedio obtenido con el método de destilación para pimiento verde fue de 1173 (+ 38, - 42) ppm. Con un coeficiente de variación de 2.35.

El valor promedio obtenido con el método colorimétrico para pimiento verde fue de 982 (+106, - 109) ppm. Con un coeficiente de variación de 7.22.

El valor promedio obtenido con el método de Titulación Directa para pimiento verde fue de 1199(+ 89, - 106) ppm. Con un coeficiente de variación de 4.70.

El valor promedio obtenido en el método de Destilación para Ejote fue de 2214.9(+ 51, - 65) ppm. Con un coeficiente de variación de 1.81.

El valor promedio obtenido en el método colorimétrico para Ejote -- fué de 1854.5(+ 73, -152) ppm. Con un coeficiente de variación de 3.90

El valor promedio obtenido en el método de titulación Directa para Ejote fue de 2149.3(+ 96, - 99) ppm. Con un coeficiente de variación de 3.15.

El valor promedio obtenido en el método de Destilación para Apio fue de 2975.3 (+ 59, - 49) ppm. Con un coeficiente de variación de 1.17.

El valor promedio obtenido por el método colorimétrico para Apio -

fue de 2297.4(+ 103, - 96) ppm. Con un coeficiente de variación de 2.35.

El valor promedio obtenido en el método de Titulación Directa para Apio fue de 2956.5 (+ 69, - 29) ppm. Con un coeficiente de variación de 1.57.

La tabla 5 son las desviaciones estandar de cada método para cada vegetal.

La tabla 6 de los coeficientes de variación expresado en %, de cada método para cada vegetal.

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos del análisis de varian- zia del factorial.

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos del análisis de varian- cia entre métodos.

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos del análisis de varian- cia entre vegetales.

La tabla 10 son los valores necesitados para la prueba estadística.

TABLA 2 -

ppm de SO<sub>2</sub> en PIMIENTO VERDE por c/u de los metodos.

		Destilación	Colorimétrico	Titulación Directa
1er. Dfa Análisis	1	1131 ppm	990 ppm	1219 ppm
"	2	1138 "	1088 "	1180 "
"	3	1146 "	1051 "	1161 "
"	4	1138 "	908 "	1191 "
"	5	1192 "	932 "	1249 "
2do. Dfa	6	1138 "	1051 "	1288 "
"	7	1177 "	920 "	1249 "
"	8	1131 "	1075 "	1288 "
"	9	1154 "	1015 "	1269 "
"	10	1177 "	1015 "	1269 "
3er. Dfa	11	1196 "	873 "	1171 "
"	12	1203 "	967 "	1132 "
"	13	1203 "	979 "	1171 "
"	14	1188 "	1064 "	1152 "
"	15	1211 "	1975 "	1132 "
4to. Dfa	16	1203 "	1003 "	1093 "
"	17	1176 "	896 "	1230 "
"	18	1197 "	884 "	1191 "
"	19	1190 "	943 "	1152 "
"	20	1170 "	908 "	1191 "
Valor mínimo		1131	873	1093
Promedio		1173.0	981.9	1198.9
Valor Máximo		1211	1088	1288
Coef. de Variación		2.35	7.22	4.70

ppm de SO<sub>2</sub> en EJOTE por cada uno de los metodos.

		Destilación	Colorimétrico	Titulación Directa
1er. Dfa Análisis	1	2150 ppm	1928 ppm	2245 ppm
"	2	2181 "	1928 "	2245 "
"	3	2158 "	1913 "	2225 "
"	4	2156 "	1866 "	2128 "
"	5	2204 "	1898 "	2108 "
2do. Dfa	6	2158 "	1928 "	2050 "
"	7	2227 "	1836 "	2108 "
"	8	2235 "	1928 "	2108 "
"	9	2243 "	1882 "	2245 "
"	10	2189 "	1898 "	2108 "
3er. Dfa	11	2158 "	1703 "	2089 "
"	12	2235 "	1792 "	2128 "
"	13	2250 "	1898 "	2245 "
"	14	2227 "	1776 "	2108 "
"	15	2250 "	1882 "	2108 "
4to. Dfa	16	2242 "	1866 "	2167 "
"	17	2250 "	1866 "	2147 "
"	18	2265 "	1851 "	2128 "
"	19	2244 "	1747 "	2245 "
"	20	2266 "	1703 "	2050 "
Valor mínimo		2150	1703	2050
Promedio		2214.9	1854.5	2149.3
Valor máximo		2266	1928	2245
Coef. de Variación		1.81	3.90	3.15

TABLA 4 -

ppm de SO<sub>2</sub> en APIO por cada uno de los metodos.

		Destilación	Colorimétrico	T Directa
1er. Día Análisis	1	3034 ppm	2252 ppm	3026 ppm
"	2	3034 "	2372 "	3006 "
"	3	3034 "	2252 "	2987 "
"	4	2988 "	2201 "	2948 "
"	5	2949 "	2269 "	2967 "
2do. Día	6	3026 "	2269 "	2850 "
"	7	2964 "	2269 "	2948 "
"	8	2949 "	2372 "	2967 "
"	9	2949 "	2390 "	2948 "
"	10	3003 "	2286 "	2928 "
3er. Día	11	2980 "	2218 "	2967 "
"	12	2926 "	2372 "	2987 "
"	13	2957 "	2235 "	3026 "
"	14	2941 "	2372 "	3006 "
"	15	2949 "	2302 "	2928 "
4to. Día	16	2941 "	2372 "	2889 "
"	17	2957 "	2269 "	2987 "
"	18	2957 "	2337 "	2889 "
"	19	2995 "	2201 "	2948 "
"	20	2972 "	2337 "	2928 "
Valor mínimo		2926	2201	2928
Promedio		2975.3	2297.4	2956.5
Valor máximo		3034	2390	3026
Coef. de Variación		1.17	2.55	1.57

TABLA 5 -

-Desviación estandar de c/u de los Metodos por cada Vegetal-

	Destilación	Colorimétrico	Titulación Directa
Pimiento Verde	27.6	70.85	56.3
Ejote	40.1	72.4	67.6
Apio	34.7	63.2	46.4

TABLA 6 -

-Coeficiente de Variación expresado en % de cada uno de los Metodos por cada Vegetal-

	Destilación	Colorimétrico	Titulación Directa
Pimiento Verde	2.35	7.22	4.70
Ejote	1.81	3.90	3.15
Apio	1.17	2.35	1.57

TABLA 7 -  
Análisis de Variancia del Factorial 3 x 3

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas
Total	88,569,205	179	497,816.8		
Celda	88,041,681.4	8	11,005,210		
Metodos	6,413,788	2	3,206,894	1040	4.73
Vegetales	80,042,861	2	40,021,380	12,977	4.73
Interacción Met-Veg.	1,585,132	4	396,283.	128	3.43
Error	527,524	171	30,85		

T A B L A 8 -

Análisis de Variancia entre métodos para su comparación  
ortogonal.-

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas
Colorimétrico- Destilación Tit. Directa	6,402,400	1	6,402,400	2075	6.79
Destilación- Tit. Directa	11,388	1	11,388	4	6.79
Error	527,524	171	3,085		

T A B L A 9 -

Análisis de Variancia entre vegetales para su comparación  
ortogonal.-

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas
Pimiento Vde.- Ejote, Apio.	66,569,160	1	6,659.160	50	6.79
Ejote-Apio	13,473,701	1	13,473,701	13	6.79
Error	527,524	171	3,085		

TABLA 10 -

Valor necesarios para la prueba estadística.

	PIMIENTO VERDE	EJOTE	APIO
Método Destilación			
$\Sigma X$	23459	44298	59505
$\bar{X}$	1173.0	2214.9	2975.3
$(\Sigma X)^2$	550324681	1962312804	3540845025
$\Sigma X^2$	27530701	98146184	177065191
Método Colorimétrico.			
$\Sigma X$	19637	37089	45947
$\bar{X}$	981.9	1854.5	2297.4
$(\Sigma X)^2$	385611769	1375593921	2111126809
$\Sigma X^2$	19375983	68880197	105632161
Método Titulación Directa			
$\Sigma X$	23978	42985	59130
$\bar{X}$	1198.9	2149.3	2956.5
$(\Sigma X)^2$	574944484	1847710225	3496356900
$\Sigma X^2$	28807424	92472305	174858708

C O N C L U S I O N E S

Una de las conclusiones que podemos sacar de las tablas 5 y 6 es que las desviaciones de los 3 métodos a medida que el nivel del sulfito aumenta se van haciendo pequeñas, los coeficientes de variación también presentan esta misma observación.

También se puede concluir que es el método de Destilación el que presenta menos desviación estandar seguido por el método de Titulación Directa y al final el método colorimétrico.

En la tabla 7 vemos que las diferencias entre métodos son altamente significativas, de las comparaciones ortogonales entre métodos (tabla 8) podemos concluir que la diferencia entre el método colorimétrico y los otros dos métodos es significativa y le corresponden más del 99% de la variación entre métodos. y que la diferencia entre el método de Destilación y el de Titulación Directa no es significativa.

De la tabla 7 podemos concluir que las diferencias entre vegetales también fueron significativas, y en las comparaciones ortogonales entre vegetales (tabla 9) podemos observar que la variación proviene en un 83% de la comparación entre el Ejote y Apio contra el Pimiento Verde y sólo en un 17% entre el Ejote y el Apio.

El Pimiento Verde presenta más variación a analizarse (esto fue coincidente en los 3 métodos). No se contesta la pregunta de que si es debido a características propias del vegetal o a su nivel de sulfitado. Para contestarla tendríamos que analizar este vegetal a 3 niveles de sulfito.

ASPECTO PRACTICO DE LOS METODOS :

1) Método Destilación :

Una vez teniendo la fuente de vapor lista, este método es rápido, la mayor parte del dióxido de azufre es removido en 5 min., pero para que el color se conserve por un min., es necesario 15 min., en total 25 min. - es suficiente para una determinación.

2) Método Colorimétrico :

La secuencia de pasos de este método es mucho más larga pero -- tiene la ventaja de que de un solo golpe puedan determinarse varias muestras.

En 1:45 Hrs. bastarían para que 5 muestras lleguen al reposo de -- 30 min.; luego 30 min. de tiempo muerto y después 15 min. en la lectura en el espectrofotómetro.

3) Método Titulación Directa :

Poner a reposar lleva a lo sumo 5 min., más 20 min. de tiempo -- muerto y 10 min. en la titulación.

Un análisis de tiempos de trabajo y tiempos muertos de 5 muestras quedaría:

	Tiempo Trabajo	Tiempo Muerto	Total
Método Destilación	125 min.	---	125 min.
Método Colorimétrico	120 "	30 min.	150 "
Método Titulación Directa	75 "	100 min.	175 "

Por lo tanto el método que menos tiempo de trabajo emplea es el -- método de titulación Directa.

En lo que se refiere a equipo y material de vidrio, el método de titulación Directa es el que menos ocupa, pues solo utiliza material común y existente en cualquier laboratorio.

Este método solo tiene la desventaja de que a veces el color del vegetal interfiere para observar el cambio de color, pero esto con un poco de práctica es superado por el analista.

De las consideraciones anteriores se concluye que para fines de control de calidad el método de Titulación Directa es el más recomendado, dada su rapidez, su aproximación de resultados y su repetibilidad de valores.

Para fines de investigación en los cuales se necesitara una aproximación mayor el método de Destilación es el más aconsejable.

El método Colorimétrico no es aconsejable en la determinación de sulfitos en vegetales deshidratados.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 1975. Págs. 366-368, 947.
- 2.- Bavor J. e Ibarz. Química General Moderna. Editora Nacional. Cuarta Edición. Págs. 383 y 384
- 3.- Bonner James and Varner J. E. Plant Biochemistry. Academic -- Press. 1965. Págs. 477.
- 4.- Borgstrom Georg. Principles of Food Science. Vol. 1. McMillan, Co. 1969. Págs. 299, 301.
- 5.- Braverman J. B. S. Introduction to the Biochemistry of Food. --- Elsevier Publishing Co. 1963. Págs. 71, 206, 207, 302 -307.
- 6.- Cruess W.V. Commercial Fruit and Vegetable Products. McGraw-Hill Book Co., Inc. 1958. Págs. 557, 566, 568, 603 y 605.
- 7.- Eskin N.A.M., Henderson H.M., Townsend R.J. Biochemistry- of Food. Academic Press. 1971. Págs. 77-79, 167.
- 8.- Fox Brian and Camerson Allan. Food Science. University of --- London Press Ltd. 1970. Págs. 89, 149, 166, 311 y 312.
- 9.- Furia Thomas. Ed. Hand Book of Food Additives. Chemical Rubbers. 1972. Págs. 142-147.
- 10.- Harris Robert, Ph. D. and Von Losrecke Harry. Nutritional --- Evaluating of Food Processing. AVI Publishing Co. 1972. Págs. 124, 149, 151, 153 - 156 y 357.
- 11.- Heid J. L., B. S. and Joslyn Maynard, M. S., Ph. D. Fundamen- tals of Food Processing Operations. AVI Publishing Co., Inc. --- 1967. Págs. 221.
- 12.- Herschdoerfer S. M. Quality Control in the Food Industry. Vol. 3. Academic Press. 1972. Págs. 119.

- 13.- Jacobs Morris, Ph. D. The Chemical Analysis of Foods and Food Products. Krieger Publishing Co. 1973. Págs. 151, 152, 155,- 159, 237, 242, 852 y 853.
- 14.- Joslyn Maynard. Methods in Food Analysis. Academic Press. -- 1970. Págs. 794-799.
- 15.- Joslyn M. A. and Braverman J. B. S. The Chemistry and Technology of the Pretreatment and Preservation of Fruit and Vegetables- Products with Sulfur Dioxide and Sulfites. 1954. Ad. Food ---- Research 5. Págs. 97-160.
- 16.- Kramer Amihud, Ph. D. and Twigg Bernard, PH. D. Quality Control for the Food Industry. Vol 1. AVI Publishing Co. 1970. -- Págs. 452 y 453.
- 17.- Kramer Amihud, Ph. D. and Twigg Bernard, Ph. D. Quality Control for the Food Industry. Vol. 2. AVI Publishing Co. 1973. --- Págs. 223 y 224.
- 18.- Nickerson John and Sinskey Anthony. Microbiology of Foods and - Food Processing. Elsevier Publishing Co. 1972. Págs. 126 y 127.
- 19.- Paul P. and Palmer H. Food Theory and Application. John Wiley. 1972. Págs. 64, 303.
- 20.- Pearson David. The Chemical Analysis of Food. Chemical Publishing Co. Sixth Ed. Págs. 29-31, 567.
- 21.- Puig Ignacio. Curso General de Química. Editorial Marín. 1963- Pág. 280.
- 22.- Reed Gerald. Enzymes in Food Processing. Academic Press. 1965 Págs. 36, 45 y 189.

- 23.- Schultz H.W., Ph. D. Food Enzymes. AVI Publishing Co. 1960.  
Págs.110 - 114.
- 24.- Snedecor W. George and Cochran G. William, Statistical Methods,  
The Iowa State University Press, 6 th. Edition 1967.
- 25.- Treibol Howars, Ph. D., Aurand Leonard, Ph. D. Food Composi--  
tion and Analysis. D. Van Nostrand Company, Inc. 1963. Págs. --  
405.
- 26.- Van Arsdel Wallace, B. S. and Copley Micheal, Ph. D. Food De--  
hydration. Vol. 1. AVI Publishing Co. 1963. Págs. 85 y 86.
- 27.- Van Arsdel Wallace, B. S. and Copley Michael, Ph. D. Food De--  
hydration. vol. 2. AVI Publishing Co. 1964. Págs. 10, 205, 245,  
255, 291, 334, 367, 482, 555.