

10 Cuadras.

61(04)

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MÉXICO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CONTENIDO DE
ACIDO ASCORBICO
EN MIELES DE ABEJA

TESIS

QUE PRESENTA

MARÍA JESÚS RUBIO SERRANO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

México, D. F.
1 9 5 7



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.

A MIS PADRES

A LA SRA. ADELA F. DE OBREGÓN SANTACILIA
POR EL ESTÍMULO QUE ME PRESTÓ DURANTE
MIS AÑOS DE ESTUDIO A SU LADO

AL ING. HÉCTOR MARTÍNEZ
CON AGRADECIMIENTO POR SU VALIOSA AYUDA

A MIS MAESTROS Y COMPAÑERAS

SUMARIO

- I. INTRODUCCIÓN.
- II. MÉTODOS DE DOSIFICACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.
- III. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN LAS MIELES.
- IV. TABLAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES.
- V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.
- VI. BIBLIOGRAFÍA.

CAPÍTULO I

En el año 1910 varios investigadores entre ellos Bolle, Bartenstein y más tarde Holts y Fröllich, observaron que los cerdos de Guinea, podrían adquirir el escorbuto encontrándose en las mismas condiciones que las personas cuando la enfermedad les atacaba, es decir, en un estado de avitaminosis. Posteriormente Zilva hacia el año de 1920, basándose en los trabajos de los anteriores investigadores, intentó aislar una substancia antiescorbútica, encontrada en el limón, sin lograrlo completamente; pero sí aclarando que dicha substancia tenía semejanza con las hexosas; que era sumamente inestable en soluciones alcalinas, y algunas otras propiedades químicas que posteriormente, al aislarla, se comprobaron. Demostró además que dicha substancia, al oxidarla, perdía totalmente sus propiedades antiescorbúticas, por lo que la denominó "factor reductor".

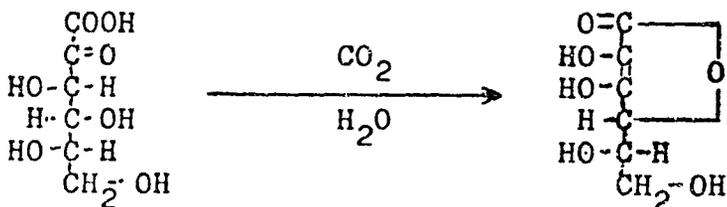
En el año 1928 Szent-Györgyi, logró aislar de las glándulas suprarrenales de una vaca, una substancia que llama "ácido hexurónico" al que atribuyó gran importancia en los procesos tisulares de óxido reducción.

Más tarde fue posible establecer una identidad entre la substancia antiescorbútica encontrada por Zilva y que J. C. Drummond denominó "vitamina C", y el ácido hexurónico de Szent-Györgyi al cual, él mismo había puesto el nombre de ácido ascórbico, cuyo isómero levógiro es idéntico a la vitamina C y Reichstein y Haworth sintetizaron por primera vez en el año de 1934.

Se llevaron a cabo gran cantidad de estudios para determinar la composición química del ácido ascórbico, el primero que le adjudicó una fórmula fue Szent-Györgyi, que propuso como

fórmula bruta $C_6 H_8 O_6$, creyendo que era una lactona del ácido glicurónico. Más tarde Karrer y sus colaboradores, opinaron que esa no era precisamente su forma, sino que estaba constituido por grupos carboxilo, carbonilo y oxhidrilos.

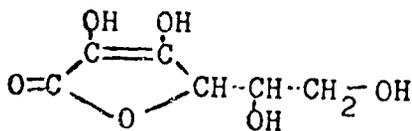
En la actualidad se sabe que el ácido ascórbico es un derivado del ácido 2-ceto, 1-gulónico, del que se obtiene por calentamiento con agua a $100^{\circ} C$ y en una atmósfera de CO_2 .



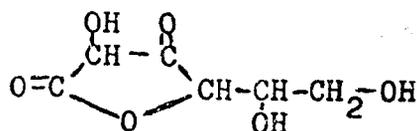
ácido 2-ceto, 1-gulónico

ácido ascórbico

El ácido ascórbico, debido a que el carboxilo no se encuentra libre sino bloqueado por un puente oxidico, presenta dos formas isómeras, la forma enólica y la forma cetónica:



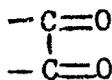
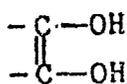
forma enólica



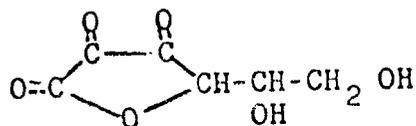
forma cetónica

Han sido innumerables las fórmulas que se le han atribuido al ácido ascórbico, con objeto de explicar tanto el poder ácido, como el poder fuertemente reductor que presenta. Después de muchas experiencias se llegó a la conclusión de que el carácter ácido de la vitamina C se debe a la presencia de dos oxhidrilos

enólicos vecinos, en su molécula, y su fuerte poder reductor reside en el paso de la forma enólica a la forma cetónica:



El compuesto derivado de esta oxidación es el ácido d hidroascórbico, llamado también anhídrido ascórbico, debido a que su formación proviene de la pérdida de una molécula de agua del ácido ascórbico.



ácido d hidroascórbico

El ácido ascórbico a la temperatura ordinaria reduce el reactivo de Fehling, el nitrato de plata amoniacal, y el permanganato de potasio. Actúa también sobre sustancias tales como iodo, azul de metileno y diclorofenol indofenol, todos ellos usados en la determinación de la vitamina C.

Este último producto es el más exacto de todos porque es el más específico, ya que tiene la propiedad de ser reducido en frío, inmediata y cuantitativamente por la vitamina C.

La existencia de la vitamina C en la miel de abeja, puede ser debida a dos factores:

1.—que el ácido ascórbico se encuentre en el néctar de las flores de las que liban las abejas, y que posteriormente depositan en el panal; o bien,

2.—que sean ellas capaces de transformar en vitamina C algunos de los alimentos que ingieren, cosa aún no comprobada por lo que las opiniones se inclinan a aceptar el primer factor.

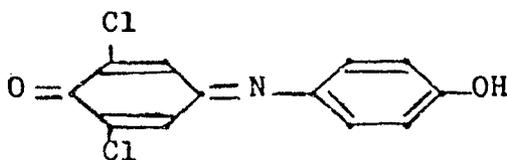
CAPÍTULO II

Los métodos para la dosificación de la vitamina C, están todos basados en su poder reductor, sobre sustancias tales como iodo, azul de metileno y diclorofenol indofenol, sin embargo, tanto el iodo como el azul de metileno tienen el inconveniente de ser poco específicos, por lo que para el caso particular de la dosificación de la vitamina en las mieles de abeja, son prácticamente inservibles, debido a que en éstas existen un gran número de sustancias que reducirían dichos reactivos dando valores erróneos.

En los estudios hechos por Zilva sobre la vitamina C, observó que el fenol indofenol, es reducido rápidamente en el aire, mediante el jugo de limón descitrado, a su base incolora con destrucción del poder antiescorbútico del jugo.

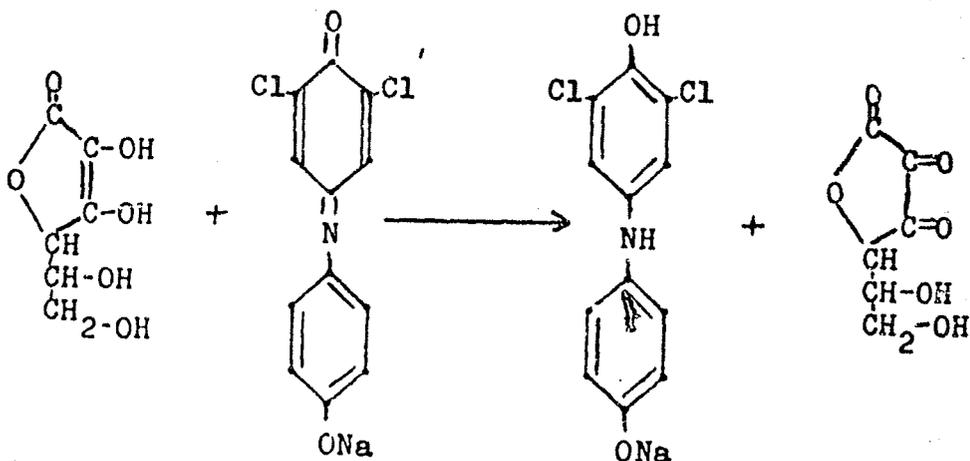
Poco tiempo después Tillmans encontró que el 2,6, diclorofenol indofenol (2,6, diclorobencenona indofenol) poseía una acción similar. Titulando con una solución valorada de colorante, dicho autor halló valores muy próximos a los obtenidos operando sobre vitamina C mediante ensayos animales.

La fórmula del 2,6, diclorofenol indofenol corresponde a:



En la práctica se usa preferentemente la sal de sodio del 2,6, diclorofenol indofenol.

La reacción que se efectúa entre la vitamina C y el colorante de Tillmans, es la siguiente:



Al método original sugerido por Tillmans se han hecho gran número de variaciones, las cuales difieren:

- 1.--en el tipo y la fuerza del solvente ácido usado para la disolución;
- 2.--en el reactivo utilizado para la eliminación de las proteínas, la cisteína, la glutatona, el ácido glúxico, los taninos y los pigmentos.
- 3.--y en el tratamiento empleado para la reducción del ácido d hidroascórbico, o para prevenir su formación.

Por lo que respecta a los solventes, Tillmans usó indistintamente, acetona, ácido acético al 2 y 5 %, ácido sulfúrico al 2 y 3 % y aún agua pura. Mayor prudencia fue observada por Emmerie y sus colaboradores, quienes adoptaron el ácido tricloroacético; y por Fujita e Iwatake quienes adoptaron el ácido metafosfórico al 2 %, ya sea solo o conjuntamente con ácido sulfúrico, los cuales actúan como solvente e inhibidor de la acción deli-

drogenante de la ascorbinasa que se halla presente en cierta clase de productos.

La titulación directa es recomendable solamente para los jugos cítricos, o también para compuestos exentos de colores naturales interferentes, y que reducirían el colorante. Investigadores como Emmerie, utilizaron para aclarar las soluciones, acetato mercúrico; Dewjatnin y Doroshenco aclaran con acetato de plomo, eliminándose luego el exceso de cualquiera de ellos con una corriente de sulfuro de hidrógeno. Dicho sulfuro de hidrógeno, que según Fujita y Ebihara actúa mejor a un pH superior a 6.0, no solo sirve para precipitar el exceso de mercurio o plomo existentes en el problema, sino que también se emplea para reducir a ácido ascórbico, algo de ácido d hidroascórbico, que pudiera hallarse presente.

Como ya dijimos anteriormente, algunos autores utilizan ácido meta fosfórico al 2 %, solo o bien, acompañado de ácido sulfúrico al 5 %, teniendo esta mezcla la ventaja de que por sí solo reduce a ácido ascórbico, el ácido d hidroascórbico existente, sin necesidad de que se trate la solución con ningún reductor especial.

CAPÍTULO III

El método de valoración elegido fue el de Emmerie y van Eekelen con la modificación de Otto, que consiste en emplear como solvente ácido, el ácido meta fosfórico, en vez del tricloroacético, que es el que se usa en el método original para obtener el extracto.

El método consiste en titular la vitamina C con una solución valorada de 2,6, diclorofenol-indofenol, realizando una precipitación preliminar con acetato mercúrico con objeto de suprimir substancias, en su mayoría protéicas, que reducen el colorante de igual forma que el ácido ascórbico.

El reactivo original fue preparado a partir de la 2,6, dicloroquinona-cloroimida, y posteriormente Tillmans lo preparó disolviendo 2,6, diclorofenol-indofenol comercial en una solución buffer de fosfatos (una parte de fosfato monopotásico, por dos partes de fosfato dipotásico) de pH 7, diluyendo la solución hasta alcanzar una normalidad de 0.0001.

Aunque las instrucciones para el método empleado, especifican comúnmente el uso del 2,6, diclorofenol-indofenol, tanto Merk como Eastman, incluyen en sus listas solamente la sal sódica. El peso molecular de ésta última es aproximadamente una doceava parte mayor que el del compuesto precedente, dato que debe tomarse en cuenta para la preparación de la solución valorada.

Para el método empleado se requieren las siguientes soluciones:

1.—Solución del colorante: solución N/1000 de 2,6, diclorofenol-indofenol sódico.

furo de hidrógeno se comprueba utilizando un papel impregnado de acetato de plomo, procediendo posteriormente a la titulación del ácido ascórbico, agregando gota a gota el reactivo, hasta que la solución tome un ligero tinte rosado.

CÁLCULOS

La fórmula usada para la determinación de la cantidad de ácido ascórbico en las mieles, es la siguiente:

$$\% = \frac{V \times N \times Meq \times 1000}{M}$$

V Volumen utilizado de 2,6, diclorofenol-indofenol sódico.

N Normalidad de la solución del colorante.

Meq Peso milimolecular del ácido ascórbico.

M Muestra de miel.

2.—Solución de acetato mercuríco: disolver 125 gr. de la sal en un litro de agua destilada.

3.—Solución de ácido meta fosfórico al 2 %.

PREPARACIÓN Y VALORACIÓN DEL REACTIVO

Para preparar el reactivo se disuelven 0.0163g. de 2,6, diclorofenol-indofenol sódico, en una pequeña cantidad de solución buffer de fosfatos de pH 7, y se diluye hasta 1000 c.c. con dicha solución.

Para la valoración de ésta solución, debe pesarse con exactitud una muestra de ácido ascórbico puro, se disuelve en agua destilada y se afora a un volumen determinado. Se toman partes alícuotas, y se colocan en matraces, agregando unos c.c. de solución de ácido meta fosfórico al 2 % a cada una de las muestras. Se deja caer desde una bureta, gota a gota, el reactivo, hasta que cese de decolorarse y aparezca en la solución un ligero tinte rosado.

PROCEDIMIENTO

Se pesa una cantidad de la muestra y se trata con ácido meta fosfórico al 2 %. Se añade solución de acetato mercuríco hasta precipitación completa, procurando que no haya exceso de reactivo. Esta precipitación se hace con objeto de eliminar substancias reductoras que podrían titularse como ácido ascórbico. Se filtra y se afora. A la solución resultante se le pasa una corriente de sulfuro de hidrógeno, con objeto de reducir el ácido d hidroascórbico existente, a ácido ascórbico, y eliminar el exceso de mercurio, que se precipita. Se deja reposar 24 horas, al cabo de las cuales se procede a filtrar la solución.

En el filtrado se elimina el exceso de sulfuro de hidrógeno, con una corriente de anhídrido carbónico. La ausencia de sul-

furo de hidrógeno se comprueba utilizando un papel impregnado de acetato de plomo, procediendo posteriormente a la titulación del ácido ascórbico, agregando gota a gota el reactivo, hasta que la solución tome un ligero tinte rosado.

CÁLCULOS

La fórmula usada para la determinación de la cantidad de ácido ascórbico en las mieles, es la siguiente:

$$f_{ac} = \frac{V \times N \times Meq \times 1000}{M}$$

V Volumen utilizado de 2,6, diclorofenol-indofenol sódico.

N Normalidad de la solución del colorante.

Meq Peso milimolecular del ácido ascórbico.

M Muestra de miel.

CAPÍTULO IV

Los cálculos de las experimentaciones que se llevaron a cabo, están basadas en muestras de 10g.

De 100g. de miel llevados a un volumen de 1000 c.c. con agua destilada, se tomaron partes alicuotas de 100 c.c. cada una.

MUESTRA Nº 1.

Nº	Gramos de miel	<i>diclofenol indofenol normal gastado c.c.</i>	<i>resultado</i>
1	10	0.0015	0.01320 g/1000
2	10	0.001505	0.013244 „
3	10	0.0015	0.03120 „
4	10	0.0015	0.01320 „
5	10	0.001505	0.013244 „
6	10	0.001495	0.013156 „
7	10	0.0015	0.01320 „
8	10	0.001505	0.013244 „
9	10	0.0015	0.01320 „
10	10	0.0015	0.01320 „

MUESTRA Nº 2.

Nº	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.001735	0.015268 g/1000
2	10	0.00173	0.015224 „
3	10	0.00173	0.015224 „
4	10	0.001735	0.015268 „
5	10	0.00173	0.015224 „
6	10	0.00173	0.015224 „
7	10	0.001735	0.015268 „
8	10	0.001735	0.015268 „
9	10	0.001735	0.015268 „
10	10	0.001735	0.015268 „

MUESTRA N° 3.

N°	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.001813	0.0159546 g/1000
2	10	0.001813	0.0159546 „
3	10	0.0018081	0.0159113 „
4	10	0.001813	0.0159546 „
5	10	0.0018081	0.0159113 „
6	10	0.0018081	0.0159113 „
7	10	0.0018081	0.0159113 „
8	10	0.001813	0.0159546 „
9	10	0.0018081	0.0159113 „
10	10	0.001813	0.0159546 „

MUESTRA N° 4.

N°	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.0015778	0.013894 g/1000
2	10	"	" "
3	10	"	" "
4	10	"	" "
5	10	"	" "
6	10	"	" "
7	10	"	" "
8	10	"	" "
9	10	"	" "
10	10	"	" "

MUESTRA Nº 5.

Nº	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.001512	0.0133056 g/1000
2	10	0.001518	0.0133584 „
3	10	0.001512	0.0133056 „
4	10	0.001512	0.0133056 „
5	10	0.001512	0.0133056 „
6	10	0.001512	0.0133056 „
7	10	0.001518	0.0133584 „
8	10	0.001518	0.0133584 „
9	10	0.001512	0.0133056 „
10	10	0.001512	0.0133056 „

MUESTRA Nº 6.

Nº	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.001740	0.013312 g/1000
2	10	"	" "
3	10	"	" "
4	10	"	" "
5	10	"	" "
6	10	"	" "
7	10	"	" "
8	10	"	" "
9	10	"	" "
10	10	"	" "

MUESTRA Nº 7.

Nº	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.0012	0.01056 g/1000
2	10	0.0012	0.01056 „
3	10	0.001205	0.010604 „
4	10	0.001205	0.010604 „
5	10	0.0012	0.01056 „
6	10	0.0012	0.01056 „
7	10	0.0012	0.01056 „
8	10	0.001205	0.010604 „
9	10	0.0012	0.01056 „
10	10	0.0012	0.01056 „

MUESTRA N° 8.

N°	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.00104	0.009152 g/1000
2	10	"	" "
3	10	"	" "
4	10	"	" "
5	10	"	" "
6	10	"	" "
7	10	"	" "
8	10	"	" "
9	10	"	" "
10	10	"	" "

MUESTRA Nº 9.

Nº	Gramos de miel	diclorofenol indofenol normal gastado c.c.	resultado
1	10	0.0014288	0.0125634 g/1000
2	10	0.0014288	0.0125634 „
3	10	0.0014335	0.0126148 „
4	10	0.0014288	0.0125634 „
5	10	0.0014288	0.0125634 „
6	10	0.0014288	0.0125634 „
7	10	0.0014335	0.0126148 „
8	10	0.0014335	0.0126148 „
9	10	0.0014288	0.0125634 „
10	10	0.0014288	0.0125634 „

MUESTRA Nº 10

Nº	Gramos de miel	<i>diclofenol indofenel normal gastado c.c.</i>	<i>resultado</i>
1	10	0.0012455	0.0109234 g/1000
2	10	0.0012455	0.0109234 „
3	10	0.0012408	0.0109190 „
4	10	0.0012455	0.0109234 „
5	10	0.0012455	0.0109234 „
6	10	0.0012408	0.0109190 „
7	10	0.0012408	0.0109190 „
8	10	0.0012408	0.0109190 „
9	10	0.0012408	0.0109190 „
10	10	0.0012455	0.0109234 „

CAPÍTULO V

La exactitud del método depende de que se obtenga una decoloración completa de la miel, ya que la presencia de colores, interfiere la reacción y da resultados erróneos.

La cantidad de ácido ascórbico existente en las mieles varía directamente con el color, es decir, que a mayor color mayor cantidad de vitamina C.

También encontramos que el porcentaje de ácido ascórbico en las mieles, no depende de la procedencia de éstas, ya sean envasadas para el comercio, o tomadas directamente del panal.

La proporción de ácido ascórbico en miel de abeja, varía entre 0.010g. y 0.015g. por Kg. de miel.

Hicimos también determinaciones en mieles de maple, obteniendo resultados negativos.

BIBLIOGRAFIA

¹ Sherman and Smith.—The Vitamins.—211-220.—Reinhold Publishing Corporation, New York. 1931.

² Rosemberg, H. R.—Chemistry and Physiology of the Vitamins.—290-322.—Interscience Publishers Inc.—New York. 1945.

³ Soto, Mario.—Farmacología Aplicada a la Terapéutica.—843-845.—Editorial El Ateneo, Buenos Aires. 1952.

⁴ Santos Ruiz, A.—Vitaminas.—126-129.—Editorial Saeta, España. 1941.

⁵ Andrew L. Winton and Kate B. Winton.—Análisis de Alimentos.—450-466.—Editorial H.A.S.A.—Buenos Aires. 1947.

⁶ Cook E. F. and E. W. Martin.—Farmacia Práctica de Remington.—1055-1057.—Editorial U.T.E.H.A.—México. 1953.

⁷ Hill, G. A. and L. Kelley.—Organic Chemistry.—839-841.—The Maple Press Co., New York, Pa. 1948.

⁸ Deulofeu, V. y A. D. Marenzi.—Curso de Química Biológica.—610-614.—Editorial El Ateneo, Buenos Aires. 1953.

⁹ Tillmans.—Chemical Abstracts, 35, 7860. 1941.

¹⁰ Walker.—J. Assoc. Official Agr. Chem. 15, 614. 1932.

¹¹ Enumerie, A. Journal Biochemistry, 28, 268. 1934.

¹² Szent Gyorgyi. Journal Biochemistry, 22, 1387. 1928, (citado por Rosenberg (2)).

¹³ Tillmans.—Z. Untersuch. Lebensm., 56, 272. 1928. (Citado por Winton and Winton (5)).