

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

---

**Efecto de la Irradiación Gamma de  $^{60}\text{Co}$  Sobre Acido Ascorbico  
En Estado de Solución Acuosa y de Solido Cristalino**

T E S I S

*Que para obtener el título de*

QUIMICO

*Presenta*

MARIA DE LOURDES PEREZ GARRIDO

MEXICO, D. F.

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.

CLAS. TesU

ADQ. 1975

FECHA

PROC. Mt 265



QUINCA

A mis padres  
Señor Patrocinio Pérez Montiel  
Señora Bertha Garrido de Pérez  
con todo mi cariño

A mis hermanos

Al Ing. Othón Canales  
A mis Maestros.

## **Agradecimiento**

Hago patente mi más sincero agradecimiento al Centro de Estudios Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en particular al M. en C. Manuel Navarrete Tejero por haberme brindado la oportunidad de realizar la parte experimental de la presente tesis en dicha institución.

Al M. en C. Luis Cabrera Mosqueda, por la dirección que me brindó y sus valiosas e imprescindibles orientaciones.

Al M. en C. Víctor Manuel Loyola Vargas por su constante ayuda, así como sus ideas y comentarios.

Al Dr. Jesús Romo Armería por las facilidades que me otorgó para hacer uso de los equipos de espectroscopía del Instituto de Química de la UNAM.

Al M. en C. Noé Rosas y al M. en C. Alberto Rodríguez por sus sugerencias y la ayuda prestada.

Así como a las personas que colaboraron para el desarrollo del presente trabajo.

## **Contenido**

	<b>página</b>
PROLOGO	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	5
MATERIALES Y EXPERIMENTACION	9
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	19
CUADROS	21
FIGURAS	31
ESPECTROS	43
BIBLIOGRAFIA	67

## Ilustraciones

### Cuadro

1. Efecto de la irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido ascórbico en estado de solución acuosa a temperatura ambiente ( $21^\circ\text{C}$ ) pp21
2. Efecto de la irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido ascórbico en estado de solución acuosa a temperatura reducida ( $2-3^\circ\text{C}$ ) pp23
3. Efecto de la irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido ascórbico en estado de sólido cristalino pp25
4. Determinación espectrofotométrica de formas acuosas de vitamina C irradiadas con rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$  a temperatura ambiente pp27
5. Determinación espectrofotométrica de forma cristalina de vitamina C irradiada con rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$  pp29

### Figura

- 1 Consola de mandos de la unidad Gamma beam – 650 y dispositivo para temperatura atenuada. pp31
- 2 Diseño de irradiación de la unidad Gamma beam – 650 para soluciones acuosas de ácido ascórbico a temperatura atenuada. pp33
- 3 Curva de irradiación de ácido ascórbico en estado de sólido cristalino, a temperatura ambiente. pp35
- 4 Curva de irradiación de ácido ascórbico en estado de sólido cristalino, a temperatura ambiente. pp37

- 5 Curva de irradiación de ácido ascórbico en solución acuosa de ácido oxálico, a temperatura ambiente. pp 39
- 6 Curva de irradiación de ácido ascórbico en solución acuosa de ácido oxálico, a temperatura ambiente. pp 41

## Espectro

- 1 Ultravioleta correspondiente a las soluciones acuosas de ácido ascórbico, irradiadas a diferentes dosis. pp 43
- 2 Ultravioleta correspondiente a la forma cristalina de ácido ascórbico, irradiada a diferentes dosis. pp 45
- 3 Infrarrojo correspondiente a la forma normal de ácido ascórbico, rango de 4 000-1 500  $\lambda$ , 1 300-400  $\lambda$ . pp 47
- 4 Infrarrojo correspondiente a la forma cristalina de ácido ascórbico, irradiada a 7.5 Krads, rango de 4 000-1 500  $\lambda$ ; 1 300-400  $\lambda$ . pp 51
- 5 Infrarrojo correspondiente a la forma cristalina de ácido ascórbico, irradiada a 75.3 Krads, rango de 4 000-1 500  $\lambda$ ; 1 300-400  $\lambda$ . pp 55
- 6 Infrarrojo correspondiente a la forma cristalina de ácido ascórbico, irradiada a 301.5 Krads, rango de 4 000-1 500  $\lambda$ ; 1 300-400  $\lambda$ . pp 59
- 7 Infrarrojo correspondiente a la forma cristalina de ácido ascórbico, irradiada a 904.7 Krads, rango de 400-1 500  $\lambda$ ; 1 300-400  $\lambda$ . pp 63



## Prólogo

El presente trabajo consiste en un estudio preliminar de irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido L-ascórbico, en estado de sólido cristalino y en solución acuosa de ácido oxálico, variando la dosis total absorbida y permaneciendo constantes la intensidad de dosis y la molaridad.

Se reportan los resultados obtenidos en las determinaciones de algunas constantes físicas tales como: pH, punto de fusión (en el caso de sólido cristalino irradiado a temperatura ambiente), y el índice de refracción (en el caso de solución acuosa de ácido oxálico irradiada a temperatura atenuada: 2-3°C).

Por otro lado, se realizaron estudios espectrofotométricos, tanto para la forma de sólido cristalino, como para la solución acuosa; en la región visible, por el método de la 2,4-dinitrofenilhidracina; ultravioleta e infrarrojo, para determinar los productos de la radiólisis de dicho ácido.

## Introducción

La transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos a estructuras útiles, mediante reacciones químicas que se operan bajo la acción de las radiaciones ionizantes, es una de las importantes posibilidades en la utilización de la energía atómica. Así, el efecto de las radiaciones sobre las estructuras orgánicas es una área nueva que promete grandes realizaciones y que conviene explorar.

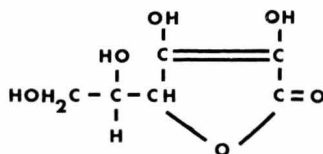
Desde hace mucho tiempo se conoce que bajo el efecto de los rayos gamma, la descomposición del agua conduce, en su mayor parte, a la formación de radicales libres. En las soluciones acuosas, la oxidación de los compuestos orgánicos por acción de la irradiación tiene lugar en ausencia de oxígeno a expensas de los radicales oxidrilo, que se forman en el agua junto con átomos de hidrógeno, en los procesos de ionización y excitación.

En tanto que, en los procedimientos de iniciación de reacciones químicas, el solvente que se halla eventualmente presente, no desempeña sino un papel de diluyente químicamente inerte que se limita a reducir la concentración del soluto. En la iniciación radioquímica; la acción de las radiaciones ionizantes no es selectiva, y los radicales que proceden de la radiólisis del solvente participan en la iniciación.

El hecho de presentar ahora un estudio sobre los efectos químicos originados por la irradiación de estructuras orgánicas obedece, sobre todo, a la importancia que está adquiriendo este tipo de energía en la conservación de alimentos y a las posibilidades de su aplicación sobre aquellas formas que en su composición incluyen al ácido ascórbico. Por el valor de esta sustancia como complemento dietético se ha dirigido el presente estudio a la investigación de su comportamiento cuando la forma que lo contiene es expuesta a una dosis de irradiación determinada.

## Antecedentes

En el año de 1928, Szent-Györgyi<sup>1</sup> aisló, por vez primera, a partir de frutas y verduras, una sustancia con propiedades antiescorbúticas. Posteriormente, en 1932, Waugh y King,<sup>1</sup> aislaron del zumo de limón, la sustancia que resultó ser igual a la aislada cuatro años antes por Szent-Györgyi, de fórmula molecular  $C_6H_8O_6$ , más tarde, al comprobar que verdaderamente se trataba de la misma sustancia se le denominó ácido ascórbico o vitamina C.



Acido L-ascórbico

### *Propiedades Físicas y Químicas:*

En condiciones normales, es un sólido blanco cristalino, soluble en agua, de peso molecular 176.3, inodoro y de sabor ácido.

Es uno de los azúcares ácidos más importantes y químicamente es la lactona de un ácido hexónico que posee una estructura de enodiol en los carbonos 2 y 3.

El ácido ascórbico, es un compuesto muy inestable, sufre con facilidad una reacción reversible de óxido-reducción con el ácido dehidroascórbico.

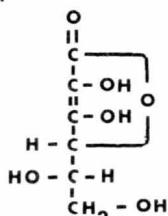


Acido L-ascórbico

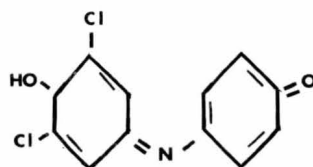
Acido dehidroascórbico

El ácido dehidroascórbico es una lactona neutra y la acidez de la vitamina misma no se debe a ningún radical carboxilo sino al grupo indol que la constituye.<sup>2</sup>

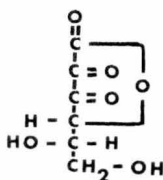
Entre las propiedades químicas del ácido ascórbico, es notable su carácter reductor. La facilidad con que se oxida reduciéndose a un derivado dehidrogenado de fórmula molecular  $C_6H_6O_6$ , constituye la base de la mayoría de los métodos químicos clásicos para valorar esta vitamina.<sup>3;4</sup> La capacidad de este compuesto para reducir a determinados colorantes permite su transformación en cinco derivados:



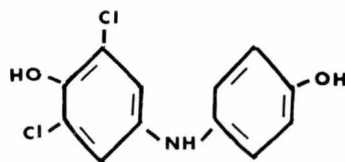
Acido L-ascórbico



2,6-diclorofenolindofenol  
(azul en alcalis, rojo en ácidos).

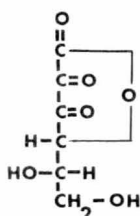


Acido dehidroascórbico

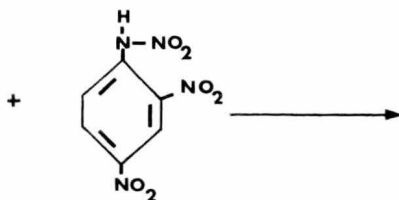


2,6-diclorofenol, 4-amino p-fenol  
(indicador reducido, incoloro).

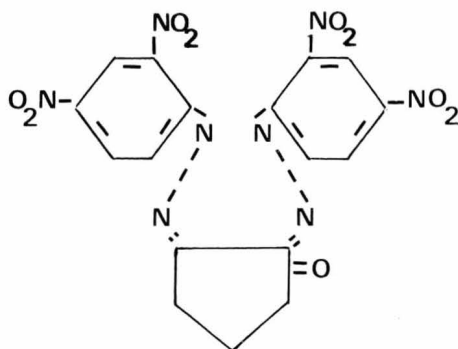
#### COPULACION .



Acido dehidroascórbico



2,4-dinitrofenilhidracina.



Osazona del ácido dehidroascórbico.  
(Color rojizo, Sol. en  $H_2SO_4$  85%, absorbe a 520-25 nm).

#### *Utilidad y Función Orgánicas:*

La mayor fuente natural de ácido ascórbico la constituyen las frutas cítricas; actualmente se sintetiza en laboratorio a nivel industrial.

Sus aplicaciones terapéuticas son aprovechadas junto con la vitamina K para modificar el efecto de coagulación de la sangre, bajo ciertas condiciones experimentales, por ejemplo si son combinadas con un agente radioprotector.<sup>5</sup> Su deficiencia se manifiesta por la presencia de hemorragias y sangrado profuso, y el tiempo de coagulación es notablemente prolongado.<sup>6</sup>

Se ha observado que en naranjas irradiadas en su madurez total con dosis de 14-280 Krads, la concentración del ácido ascórbico experimenta, al igual que los azúcares reductores presentes, un decremento progresivo en función de la dosis de exposición.<sup>7</sup>

En fresas irradiadas de 100 a 300 Krads y almacenadas a  $4^\circ C$ , el contenido de ácido ascórbico experimenta un decremento con dosis mayores de irradiación; sin embargo, en las correspondientes a dosis menores, 100 a 200 Krads, la concentración del ácido se incrementa favorablemente.<sup>7;8</sup>

En papas y zanahorias, la irradiación a dosis mayores de 250 Krads aceleró la pérdida de vitamina C, después de una semana de almacenamiento.<sup>9</sup>

Se han realizado estudios en hojas de algodón<sup>10</sup> encontrándose una dependencia en el decremento de la concentración ácida con el incremento en el tiempo de exposición; también se han efectuado experiencias en semillas de tomate secadas al ambiente e irradiadas con rayos gamma de <sup>60</sup>Co a dosis de 500, 750, 1,000, 5,000 y 10,000 Krads. Se han realizado estudios sobre el efecto que este tipo de radiación provoca en la vitamina C concentrada, en hojas en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados informan que, cuando se irradian hojas en la época de florecimiento de la planta con dosis de 750, 5,000 y 10,000 rads, se incrementa la concentración de esta vitamina.

En todos los casos, el efecto de la irradiación en el incremento o decremento de la vitamina C, no siempre es idéntico en las diversas formas vegetativas en que ésta se halla presente.<sup>11;12</sup>

## Materiales y Experimentación

### 1. ESPECTROFOTOMETRO UNICAM Modelo SP-500

Esta unidad ha sido empleada para las lecturas de las distintas determinaciones espectrofotométricas de ácido ascórbico en solución de ácido oxálico. El equipo tiene las siguientes características: Límites de longitud de onda: 186 a 1,000 nm. Lámparas: deuterio refrigerado con aire, lámpara con filamento de tungsteno y deuterio, arco refrigerado con aire, con selección automática de lámpara al elegir la longitud de onda.

Exactitud en la selección de la longitud de onda:

$\pm 0.2$ nm	200 nm
$\pm 1.0$ nm	400 nm
$\pm 2.5$ nm	600 nm

Exactitud en la lectura: 0.3% T (T = Transmisión).  
Abertura: aberturas bilaterales curvadas continuamente variables arriba de 2 nm.

Unidad de detección: Esta consiste en un compartimiento libre de humedad conteniendo las dos fotoceldas. La azul (contenida en una envoltura de sílica), se utiliza para el intervalo de 186-625 nm y la roja se emplea en el de 625-1,000 nm.

### 2. ESPECTROFOTOMETRO DE ULTRAVIOLETA (UV).

El examen se ha realizado en un equipo Perkin Elmer 202 automático de doble haz.

### 3. ESPECTROFOTOMETRO DE INFRARROJO (IR).

Las determinaciones fueron hechas en un espectrofotómetro Perkin Elmer mod. 337 con rejilla, mediante la técnica de pastillas de KBr.

#### 4. POTENCIOMETRO

Las determinaciones del pH se hicieron en un BECKMAN RESEARCH pH METER Mod. 101900 a 17°C, el cual fue calibrado usando una solución buffer para pH de  $2.27 \pm 0.02$  a 25°C.

#### 5. REFRACTOMETRO

Para las determinaciones de índice de refracción se utilizó el refractómetro Abbe 3L de Bausch & Lomb.

#### 6. APARATO DE PUNTO DE FUSION Fisher-Johns.

Melting point apparatus, Serie No. 4006.

### *DISEÑO DE IRRADIACION*

El experimento se realizó con muestras de ácido ascórbico en estado de sólido cristalino y en disolución acuosa.

Las muestras fueron colocadas en celdas de polietileno de  $2 \times 1$  cm, para la forma cristalina. En el segundo caso, las muestras se colocaron en celdas de vidrio Pyrex diseñadas especialmente para esta finalidad, en las que pudo regularse la temperatura durante el proceso. Figuras 1 y 2.

El proceso de irradiación se llevó a cabo con radiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  en la unidad Gammabeam-650 (tipo IR-31, con una actividad de 42,700 Curios durante el período de trabajo), del Centro de Estudios Nucleares de la UNAM, la celda que contenía las muestras se colocó sobre un soporte de madera de 2.2 m de altura sobre el nivel del piso de tal manera que, dicho recipiente quedase en el centro del irradiador; utilizando las 12 fuentes con una abertura de 65 cm para exposición a la razón de dosis de 100 rads/seg.



## *EXPERIMENTACION:*

Con el objeto de establecer límites de confiabilidad en el examen considerado, la proyección del estudio se hizo por triplicado para las formas en disolución y para las del estado cristalino. El tratamiento radiolítico de las formas acuosas se hizo a temperatura ambiente (21°C) y a temperatura de 2-3°C y las formas cristalinas a temperatura ambiente. En las determinaciones analíticas se observaron las mismas consideraciones para las formas cristalinas y en disolución respectivamente.

### *MODUS OPERANDI PARA FORMAS EN DISOLUCION ACUOSA*

Se preparó una solución acuosa de ácido oxálico a 0.5% en 100 ml y en ella se disolvieron 0.5 g de ácido L-ascórbico.

El empleo del ácido oxálico, en la concentración antes referida, permite efectuar los ensayos correspondientes libres de reacciones interferentes de oxidación a las que es sensible el ácido en estudio.

El ácido L-ascórbico en estado de sólido cristalino (0.500 g) y en las condiciones de disolución antes indicadas, fueron transferidos a las celdas correspondientes para su exposición al efecto radiante, con los resultados que se señalan en los cuadros números: I, II y III.

Las formas cristalinas y las disoluciones ácidas irradiadas, fueron examinadas por las siguientes técnicas:

1. Determinaciones fotométricas de vitamina C con 2,4-dinitrofenilhidracina.
2. Determinaciones espectrofotométricas en UV —ESPECTROS 1 y 2.

## DETERMINACION FOTOMETRICA DE VITAMINA C CON 2,4-DINITROFENILHIDRACINA

FUNDAMENTO: El ácido dehidroascórbico reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina para formar una 2,4-dinitrofenilhidrazona, la cual se disuelve con un color rojo en altas concentraciones de ácido sulfúrico. La máxima absorción es a 525-520 nm. Esto proporciona un método comparativo, simple de determinación entre el ácido dehidroascórbico y el contenido total de vitamina C, cuadros IV y V; las lecturas indicadas en estos cuadros representan el promedio de 3 determinaciones para cada caso (1-a, 1-b, 1-c =  $\bar{I}$ ).

El ácido 2,3-dioxo-L-glucónico, es un producto de oxidación libre de la actividad de la vitamina C de la misma reacción. Este ácido puede determinarse separadamente después de la reducción de cualquier ácido dehidroascórbico presente, con ácido sulfúrico y la cantidad sustraída, cuando se calcula el contenido total de vitamina C. La determinación del ácido 2,3-dioxo-L-glucónico es de poca importancia práctica, puesto que la cantidad en su forma oxidada presente en productos naturales, es generalmente muy pequeña en comparación con el contenido de ácido ascórbico.

*Oxidación del ácido dehidroascórbico.* Roe y Kuether<sup>13</sup> trataron la solución problema con carbón activado (norita) para convertir el ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico. La bromina fue usada también, posteriormente, como agente oxidante.<sup>14</sup> En el laboratorio se puede determinar el mejor agente, el cual puede ser el 2,6-diclorofenolindofenol, un agente oxidante débil introducido primero en el método de la dinitrofenilhidracina.

*Tiourea.* Para evitar la descomposición de ácido dehidroascórbico durante las tres horas de condensación con

2,4-dinitrofenilhidracina, se agrega un poco de tioréa a la solución. Esto proporciona un medio reductor débil, que al mismo tiempo, previene la decoloración de la 2,4-dinitrofenilhidracina en solución por cualquier otro producto de oxidación más fuerte.

*Condensación.* La razón de condensación entre el ácido dehidroascórbico y la 2,4-dinitrofenilhidracina para dar la osazona correspondiente, se incrementa con el aumento de temperatura. Roe y Kuether<sup>1 3</sup> llevaron a cabo la reacción a 37°C en un tiempo de tres horas. Schaffert, Kingsley, Polk y otros efectuaron la determinación en un baño de agua hirviendo (tiempo: 5 ó 10 min). Roe<sup>1 7</sup> señaló, sin embargo, que la glucosa, fructuosa y el ácido glucourónico también reaccionaban notablemente a temperaturas superiores a 37°C, obteniéndose así mayores contenidos. Esta interferencia ocurre incluso a 37°C si la concentración de carbohidratos solubles es varias veces la de la vitamina C como en los jugos de frutas. Si la dinitrofenilhidrazona de carbohidratos solubles, se separa de las dinitrofenilhidrazonas del ácido dehidroascórbico por cromatografía en capa fina,<sup>1 8</sup> la temperatura a la que la condensación se lleva a cabo no es de consecuencias interferentes con el proceso.

*Aplicaciones.* La determinación espectrofotométrica con 2,4-dinitrofenilhidracina es de aplicación general, previendo que la solución de la muestra contenga un mínimo de 2 µg de vitamina C por ml. Si la medición se lleva a cabo con microceldas semejantes y compensadas, pueden determinarse bajas concentraciones. Sin embargo, desde que el método volumétrico dio resultado satisfactorio en preparaciones farmacéuticas, el uso de la 2,4-dinitrofenilhidracina es usualmente relegado para las determinaciones de vitamina C en muestras biológicas. Ya que el ácido ascórbico podría ser oxidado a ácido dehidroascórbico antes de la

reacción con la 2,4-dinitrofenilhidracina, el método es particularmente adecuado para el análisis de vitamina C total en fluidos biológicos como sangre,<sup>19</sup> orina,<sup>20</sup> en productos vegetales,<sup>21;22</sup> alimentos y forrajes.<sup>18</sup>

### *REACTIVOS:*

Acido Ascórbico, Q.P. (Eastman Organic Chemicals)  
 Acido Oxálico, Q.P. (Monterrey)  
 Acido Sulfúrico, Q.P. (Monterrey)  
 Alcohol Etílico, Q.P. (J.T. Baker)  
 Eter Etílico, Q.P. (J.T. Baker).  
 2,6-Diclorofenolindofenol, G.R. (Eastman Organic Chemicals)  
 2,4-Dinitrofenilhidracina (DPNH) G.R. (Eastman Organic Chemicals)  
 Fenoltaleína, Q.P. (Eastman Organic Chemicals)  
 Tiourea, Q.P. (Eastman Organic Chemicals)

### *PREPARACION DE REACTIVOS*

1. Solución de ácido oxálico: 5 g de ácido oxálico G.R. se llevan al aforo en un litro de agua.
2. Solución de ácido ascórbico, exactamente 0.5 g de ácido ascórbico L (+) G.R. se disuelven en 100 ml de la solución de ácido oxálico en un matraz volumétrico de 100 ml.
3. Solución de tiourea: 10 g de tiourea G.R. se disuelven en 100 ml de una mezcla de volúmenes iguales de etanol absoluto y agua.
4. Solución de 2,6-diclorofenolindofenol: 0.25 g de 2,6-diclorofenolindofenol de sodio G.R. se disuelven en 100 ml de agua.

5. Solución de dinitrofenilhidracina (DNPH): 2 g de 2,4-dinitrofenilhidracina se disuelven en 100 ml de una mezcla de tres volúmenes de agua y un volumen de ácido sulfúrico 95-97% (d, 1,84) G.R.

6. Eter etílico G.R.

7. Acido sulfúrico 85%: 85 g de ácido sulfúrico del 95-97% (d, 1.84) G.R. se añaden cuidadosamente y con movimiento en baño de hielo a 15 ml de agua destilada.

*Método de extracción.* Las muestras sólidas se extraen con soluciones de ácido oxálico por desintegración mecánica (por ejemplo en un disgregador-batidor eléctrico de cuchillas). En algunos casos, cuando el material que nos interesa es una planta, se aconseja calentar la solución de ácido oxálico para efectuar las extracciones con rapidez. Las proteínas se eliminan de plantas y sangre por adición de ácido tricloroacético. La solución de ácido oxálico se agrega a las muestras líquidas (como jugos de frutas) para estabilizar al ácido ascórbico. Si la vitamina C contenida en la muestra es pequeña, puede agregarse suficiente ácido oxálico cristalino, en el líquido para llevar la concentración del ácido oxálico hasta cerca de 0.5 por 100, aproximadamente. Una vez preparada para el análisis, la solución (o extracto) se diluye con la solución de ácido oxálico hasta que la concentración de vitamina C se halle comprendida entre 5 y 50  $\mu\text{g}$  en 4 ml.

*Oxidación.* Un exceso de 2,6-diclorofenolindofenol en solución se agrega a un volumen de aproximadamente 50 ml de solución de muestra en un embudo de separación. Después de cerca de dos minutos, el exceso de 2,6-diclorofenolindofenol es removido por extracción con 50 ml de éter etílico. La capa acuosa se recoge en un matraz aforado de la capacidad adecuada (por ejemplo, 50 ml). La capa etérea se lava con pequeñas porciones de solución oxálica. Estos lavados se utilizan para llenar el matraz de medida.

Luego la solución se afora con solución de ácido oxálico. Se filtra si es necesario.

*Condensación con 2,4-dinitrofenilhidracina.* De 1 a 4 ml del ácido dehidroascórbico en solución, conteniendo una cantidad esperada de 5-50  $\mu\text{g}$  de vitamina C, se transfieren a dos matraces de 25 ml cada uno. Si la alícuota es menor de 4 ml, se aumenta su volúmen con solución de ácido oxálico, agregando dos gotas de solución de tiourea.

Una de las soluciones (Determinación principal) se trata con un ml de solución DNPH agitándola, se deja reposar a 37°C por 3 horas para finalmente enfriar con hielo por diez minutos.

La otra solución (la determinación del blanco), también se enfria con hielo y se trata con un ml de solución DNHP. Las dos soluciones se llevan al aforo con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 85% agregado en pequeñas proporciones con movimiento y permitiendo que alcance la temperatura ambiente.

*Solución de referencia.* Una solución de referencia, conteniendo una cantidad de ácido ascórbico igual al esperado en la solución problema, se oxida con el 2,4-diclorofenolindofenol y se condensa con solución DNPH, siguiéndose exactamente el mismo proceso observado para la muestra. La solución de referencia, se prepara siguiendo los mismos pasos para la muestra pero sin agregar vitamina C.

*Medida.* Las diluciones de las soluciones de muestra y referencia, se determinan en una celda de 1 cm de ancho con una absorción máxima a 520-525 nm usando el filtro correspondiente contra la solución blanco.

*Cálculos.*

$$\frac{E_s - E_{sB1}}{E_R - E_{RB1}} \times R (\mu\text{g}) = \mu\text{g de vitamina C, total en el volumen de la solución de la muestra usada para condensación con DNPH.}$$

En donde:

- $E_s$ .. Absorción de la solución problema
- $E_{sB1}$ .. Absorción de ácido ascórbico consumido en la solución problema.
- $E_R$ .. Cantidad (en  $\mu\text{g}$ ) de ácido ascórbico presente en el volumen de la solución de referencia utilizado.
- $E_{RB1}$ .. Absorción de ácido ascórbico consumido en la solución problema.

*Acido dehidroascórbico.* Si sólo interesa determinar el contenido en ácido dehidroascórbico, se omite la oxidación inicial con 2,6-diclorofenolindofenol. La diferencia entre la concentración inicial del ácido ascórbico y el contenido en ácido dehidroascórbico, rinde la concentración de ácido transformado presente en la muestra.

*Curva de calibración.* Sí esta técnica se va a utilizar para análisis rutinario, es aconsejable trazar una curva de calibración con una solución de referencia como se describe a continuación: 10 ml de una solución acuosa conteniendo 250  $\mu\text{g}$  de ácido L[+]-ascórbico se oxida con 2,6-diclorofenolindofenol y se extrae con éter etílico. La capa acuosa se lleva al aforo con los lavados etéricos hasta 25 ml, se pipetea en matraces volumétricos de 10 ml alícuotas de 0.5 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 3.0 ml, y 4.0 ml de ácido ascórbico. Porciones de estas soluciones se transfieren a un matraz de 10 ml. La solución se afora hasta 4 ml con ácido oxálico en solución y se trata condensándola a 37°C y diluyendo con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 85%.

Las diluciones de estas soluciones se miden en una celda de un cm de ancho a una absorción máxima de 520-525 nm, usando el filtro correspondiente contra un blanco de reactivos (mezcla de 4 ml de solución de ácido oxálico, 2 gotas de tiourea en solución, 1 ml de solución DNPH y 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 85%).

## Resultados y Conclusiones

Los espectros de ultravioleta, del ácido ascórbico irradiado en solución de ácido oxálico muestran que la variación en las longitudes de onda de las diferentes curvas es muy pequeña y no se pueden considerar cambios en la estructura del ácido ascórbico a las dosis que se ha trabajado, lo que se puede observar es que la absorción decrece gradualmente, conforme se aumenta la dosis total absorbida, espectros 1, 2.

Los resultados obtenidos en los espectros de infrarrojo de las muestras en estado de sólido cristalino, nos indican que no hubo modificación en la estructura interna del ácido ascórbico, ya que las longitudes de onda debidas a las uniones carbono-oxígeno, carbono-hidrógeno y oxígeno-hidrógeno, se presentan en la misma región que las del espectro infrarrojo patrón, espectros 3-7.

Sin embargo, se observa que la absorción decrece gradualmente a medida que aumenta la dosis total absorbida, y en el porcentaje de transmisión sucede que a mayor dosis total absorbida aumenta dicho parámetro.

En general, los cambios que se producen durante la irradiación de soluciones de vitamina C, son considerablemente más drásticos que los que se producen en los cristales, como se puede apreciar en las figuras 3-6.

Se puede concluir que en la radiólisis del ácido ascórbico uno de los compuestos que se forman en mayor porcentaje es el ácido dehidroascórbico, tanto en cristales como en solución (ver resultados en las figuras 3 y 5), ya que se nota un aumento en su contenido hasta un máximo, coincidiendo éste para el caso de las soluciones de ácido ascórbico con un mínimo en el contenido del mismo ácido.

Probablemente el ácido dehidroascórbico no es el único producto de la radiólisis del ácido ascórbico, por lo que es importante y se recomienda emplear técnicas tales como cromatografía líquida, cromatografía de gases y resonancia paramagnética electrónica para determinar los demás productos.



## CUADRO I

Efecto de la irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido ascórbico  
 en estado de solución acuosa a temperatura ambiente (21°C)

<i>No. de orden</i>	<i>Volumen (ml)</i>	<i>Dosis (Krad/s)</i>	<i>n</i> <i>20<sup>D</sup></i>	<i>pH</i> <i>a 17°C</i>
1	100	0	1.3350	3.05
1-a	100	1.50	1.3355	3.07
1-b	100	1.50	1.3352	3.01
1-c	100	1.50	1.3351	3.04
2-a	100	7.54	1.3357	3.10
2-b	100	7.54	1.3354	3.21
2-c	100	7.54	1.3352	3.15
3-a	100	15.08	1.3355	3.37
3-b	100	15.08	1.3356	3.20
3-c	100	15.08	1.3357	3.25
4-a	100	37.70	1.3353	3.27
4-b	100	37.70	1.3354	3.31
4-c	100	37.70	1.3359	3.35
5-a	100	75.39	1.3358	3.37
5-b	100	75.39	1.3354	3.31
5-c	100	75.39	1.3357	3.35
6-a	100	150.78	1.3355	3.39
6-b	100	150.78	1.3357	3.41
6-c	100	150.78	1.3353	3.36
7-a	100	301.56	1.3352	3.45
7-b	100	301.56	1.3355	3.41
7-c	100	301.56	1.3354	3.49

## CUADRO II

Efecto de la irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido ascórbico  
en estado de solución acuosa a temperatura reducida (2-3°C)

<i>No. de orden</i>	<i>Volumen (ml)</i>	<i>Dosis (Krad/s)</i>	<i>n</i> <i>20<sup>D</sup></i>	<i>pH</i> <i>a 17°C</i>
1		0		
1-a	100	1.50	1.3355	3.06
1-b	100	1.50	1.3351	3.08
1-c	100	1.50	1.3354	3.02
2-a	100	7.54	1.3357	3.37
2-b	100	7.54	1.3355	3.32
2-c	100	7.54	1.3356	3.39
3-a	100	15.08	1.3353	3.40
3-b	100	15.08	1.3354	3.42
3-c	100	15.08	1.3352	3.38
4-a	100	37.70	1.3359	3.33
4-b	100	37.70	1.3358	3.31
4-c	100	37.70	1.3359	3.35
5-a	100	75.39	1.3359	3.39
5-b	100	75.39	1.3357	3.36
5-c	100	75.39	1.3356	3.42
6-a	100	150.78	1.3353	3.37
6-b	100	150.78	1.3354	3.35
6-c	100	150.78	1.3352	3.39
7-a	100	301.56	1.3355	3.35
7-b	100	301.56	1.3356	3.38
7-c	100	301.56	1.3354	3.33

## CUADRO III

Efecto de la irradiación gamma de  $^{60}\text{Co}$  sobre ácido ascórbico  
en estado de sólido cristalino

<i>No. de orden</i>	<i>Dosis (Krad)</i>	<i>Punto de fusión °C</i>
1	0	190-92
1-a	1.50	190-92
1-b	1.50	190-92
1-c	1.50	190-92
2-a	7.54	190-93
2-b	7.54	191-93
2-c	7.54	191-93
3-a	15.08	191-93
3-b	15.08	192-94
3-c	15.08	191-93
4-a	37.70	190-92
4-b	37.70	190-93
4-c	37.70	190-92
5-a	75.39	192-94
5-b	75.39	191-93
5-c	75.39	191-93
6-a	150.78	190-92
6-b	150.78	192-94
6-c	150.78	192-94
7-a	301.56	191-93
7-b	301.56	189-92
7-c	301.56	191-93

## CUADRO IV

**Determinación fotométrica de formas acuosas de vitamina C irradiadas con rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$  a temperatura ambiente**

<i>No. de orden</i>	<i>Dosis (Krad)</i>	<i>DO<sub>p</sub></i>	<i>DO<sub>t</sub></i>	<i>C<sub>p</sub> (μg/ml)</i>	<i>C<sub>t</sub></i>	<i>Vitamina C (μg/ml)</i>
1	0	0.112	0.986	0.927(C <sub>pb</sub> )	8.185(C <sub>tb</sub> )	8.185
1	1.50	0.114	0.991	0.949	8.223	8.200
2	7.54	0.110	0.938	0.910	7.780	7.780
3	15.08	0.130	0.871	1.081	7.230	7.075
4	37.70	0.136	0.852	1.124	7.070	6.873
5	75.39	0.127	0.987	1.054	8.183	8.060
6	150.78	0.124	0.997	1.031	8.296	8.170
7	301.56	0.118	0.976	0.982	8.101	8.045

## Terminología:

D.O.p. Densidad Optica parcial

D.O.t. Densidad Optica total

C<sub>p</sub>. Contenido de ácido de hidroascórbico parcialC<sub>t</sub>. Contenido de ácido de hidroascórbico totalC<sub>pb</sub>. Contenido de ácido de hidroascórbico parcial del blancoC<sub>tb</sub>. Contenido de ácido de hidroascórbico total del blanco

$$\text{Vit. C } (\mu\text{g/ml}) = C_t - (C_p - C_{pb})$$

## CUADRO V

Determinación fotométrica de formas cristalinas de vitamina C irradiadas con rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$

<i>No. de orden</i>	<i>Dosis (Krads)</i>	$DO_p$	$DO_t$	$C_p$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$C_t$	<i>Vitamina C</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0	0.099	0.895	0.655( $C_{pb}$ )	7.427( $C_{tb}$ )	7.427
1	1.50	0.077	0.837	0.658	6.948	6.950
2	7.54	0.087	0.924	0.725	7.665	7.596
3	15.08	0.092	0.860	0.497	7.136	7.136
4	37.70	0.080	0.322	0.664	6.904	6.896
5	75.39	0.085	0.821	0.698	7.357	7.315
6	150.78	0.094	0.887	0.780	7.460	7.335
7	301.56	0.085	0.893	0.719	7.410	7.340



Figura 1. Consola de mandos de la Unidad Gamma-beam-650 y dispositivo para temperatura atenuada.

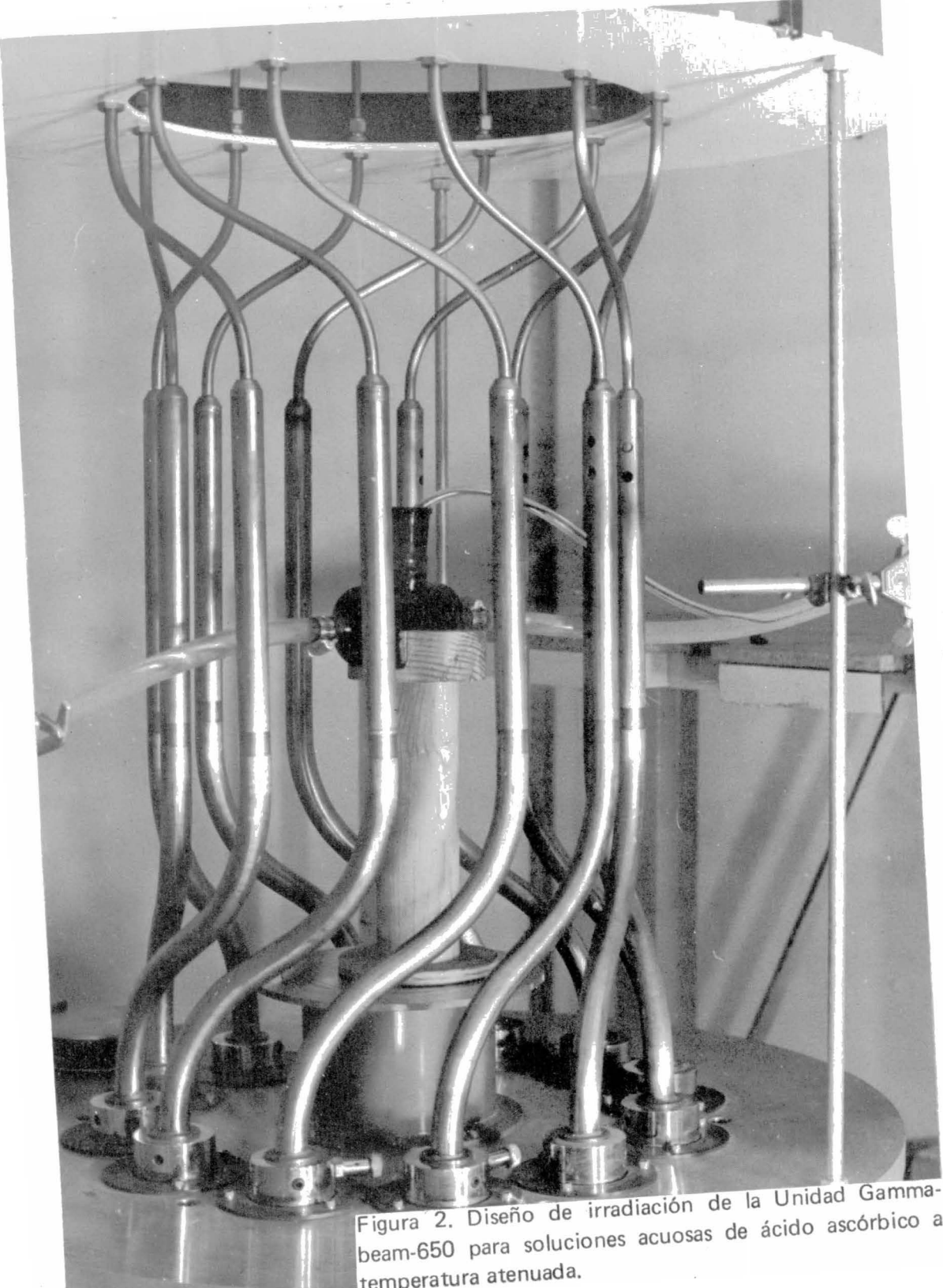


Figura 2. Diseño de irradiación de la Unidad Gamma-beam-650 para soluciones acuosas de ácido ascórbico a temperatura atenuada.

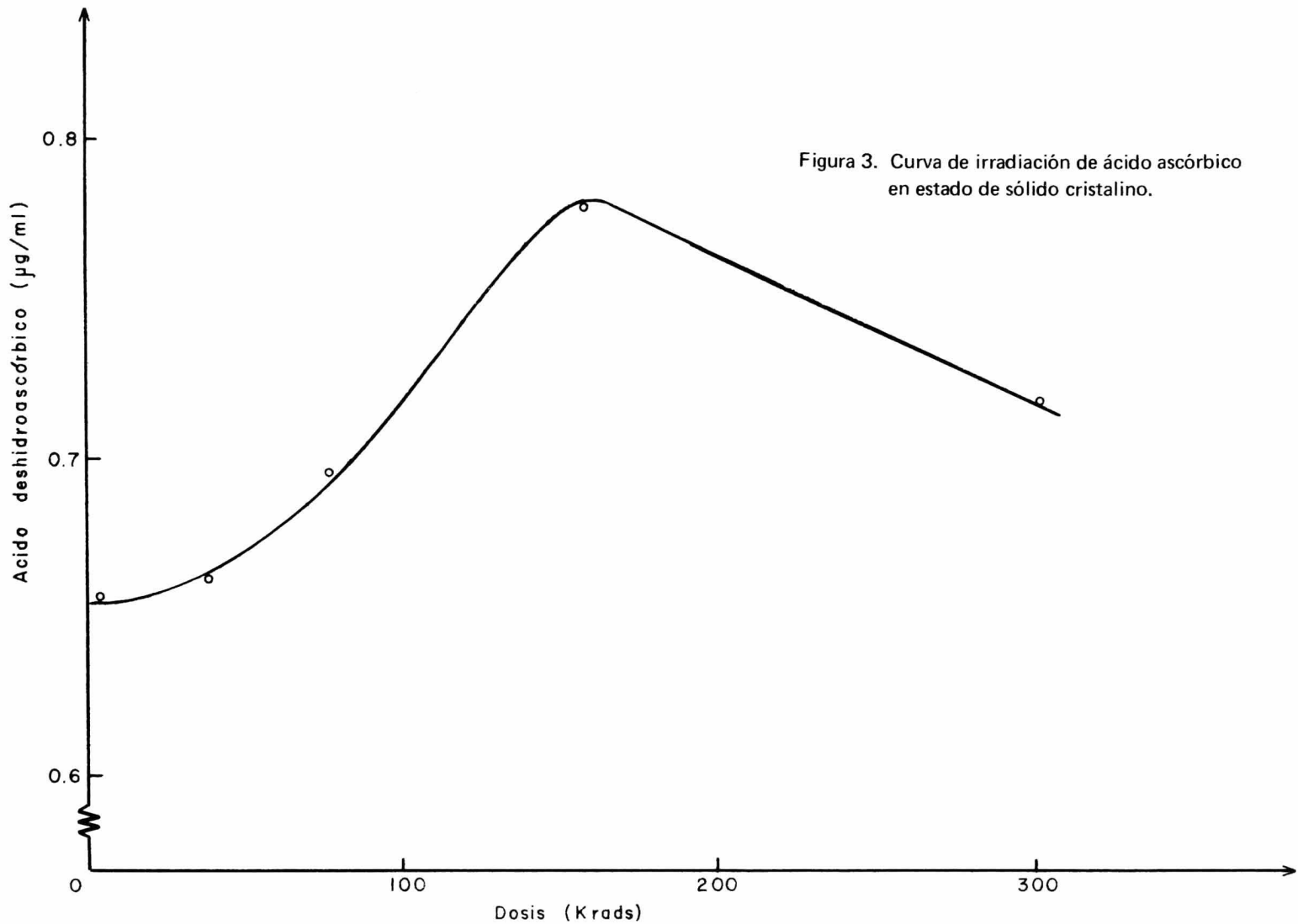
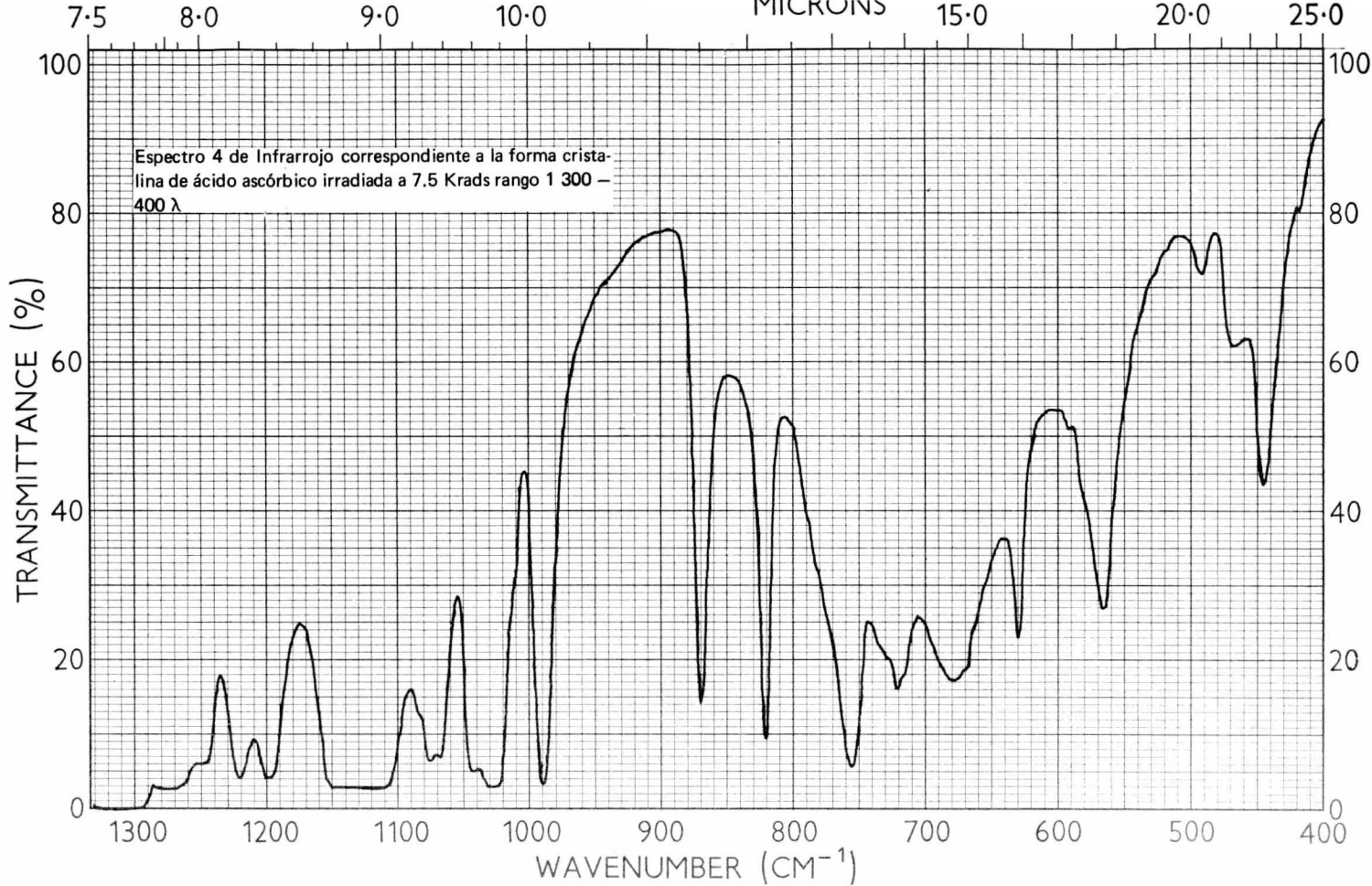
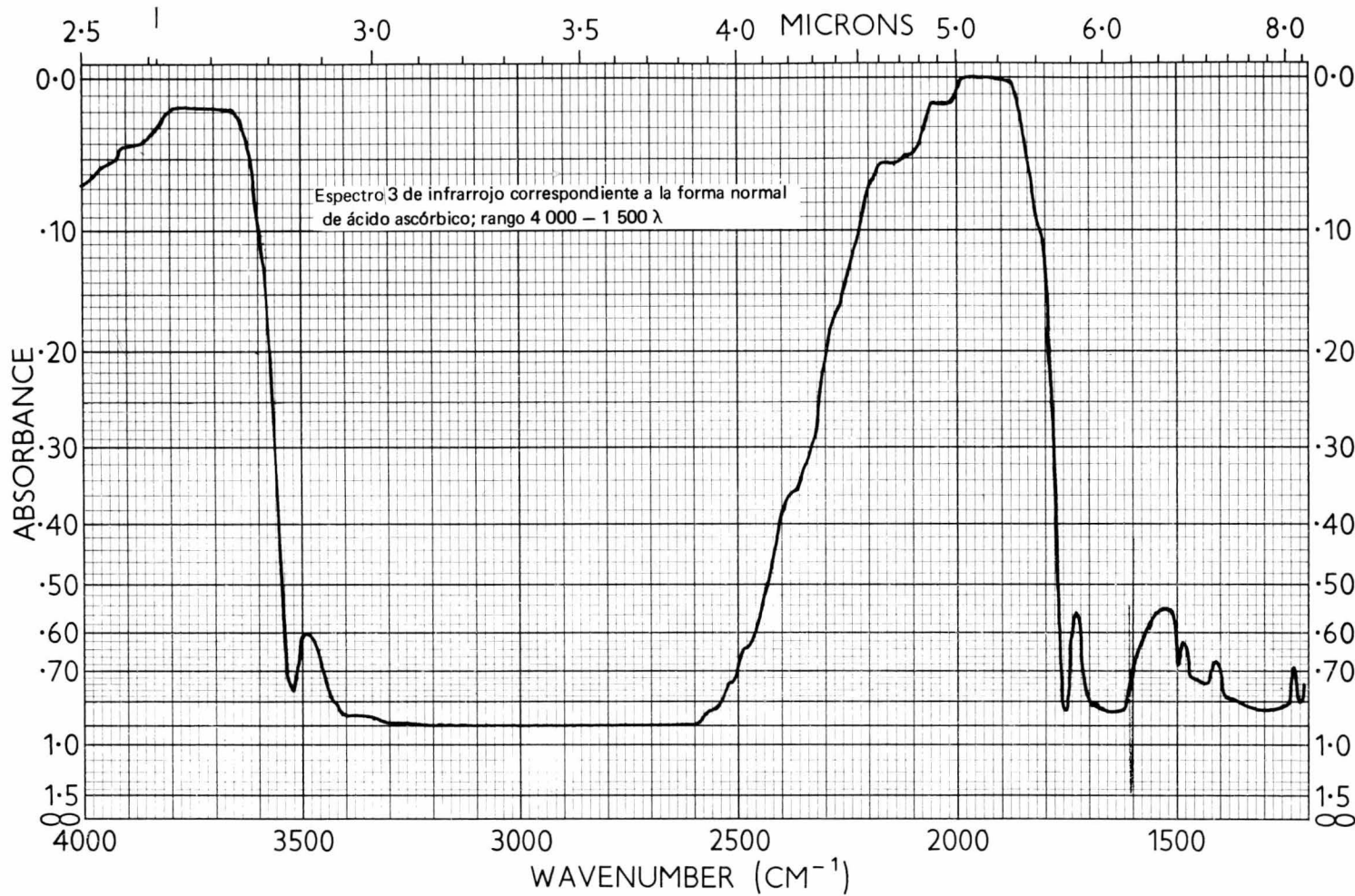


Figura 3. Curva de irradiación de ácido ascórbico en estado de sólido cristalino.



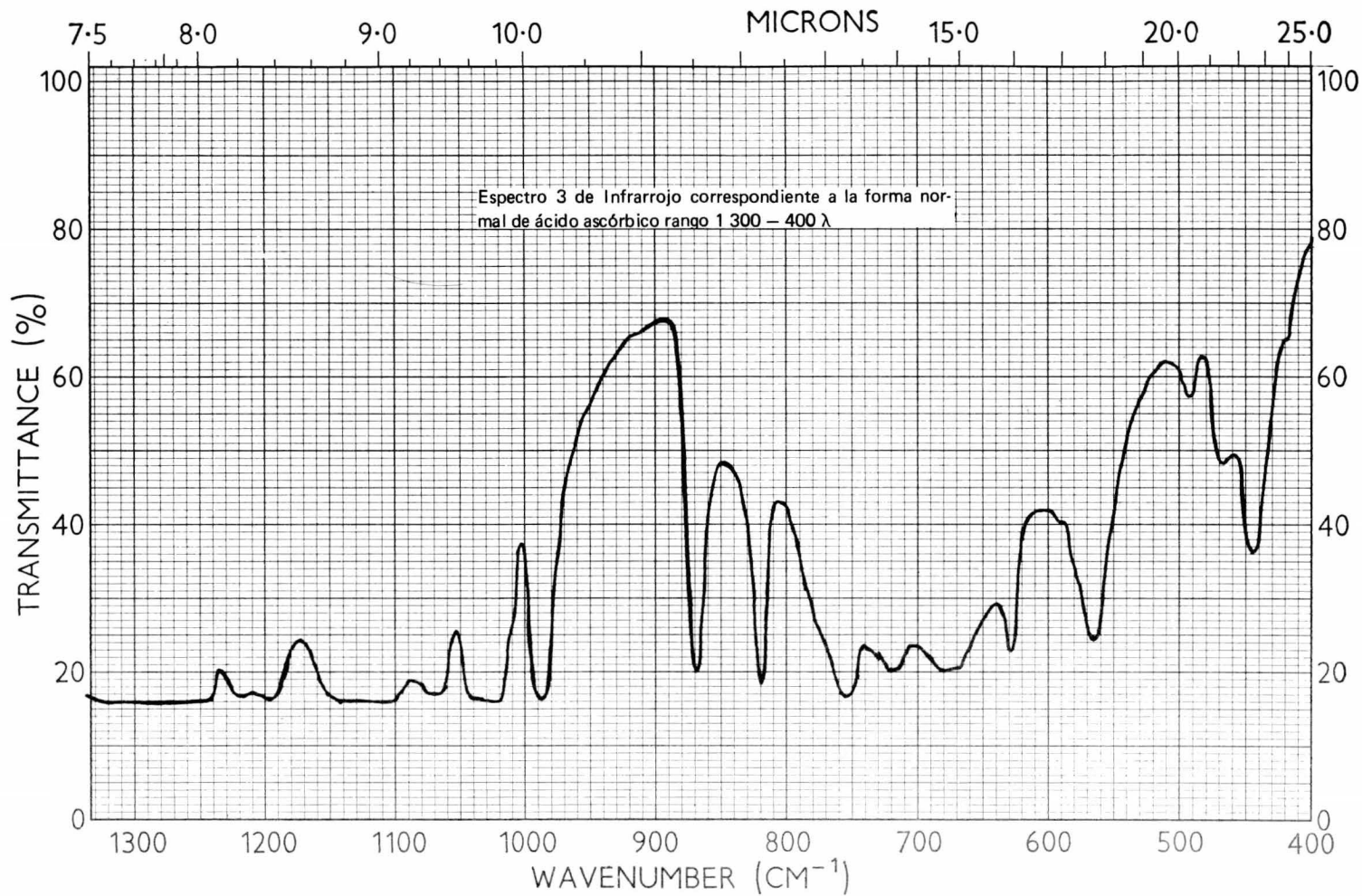


SAMPLE <b>No 2</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>N</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		



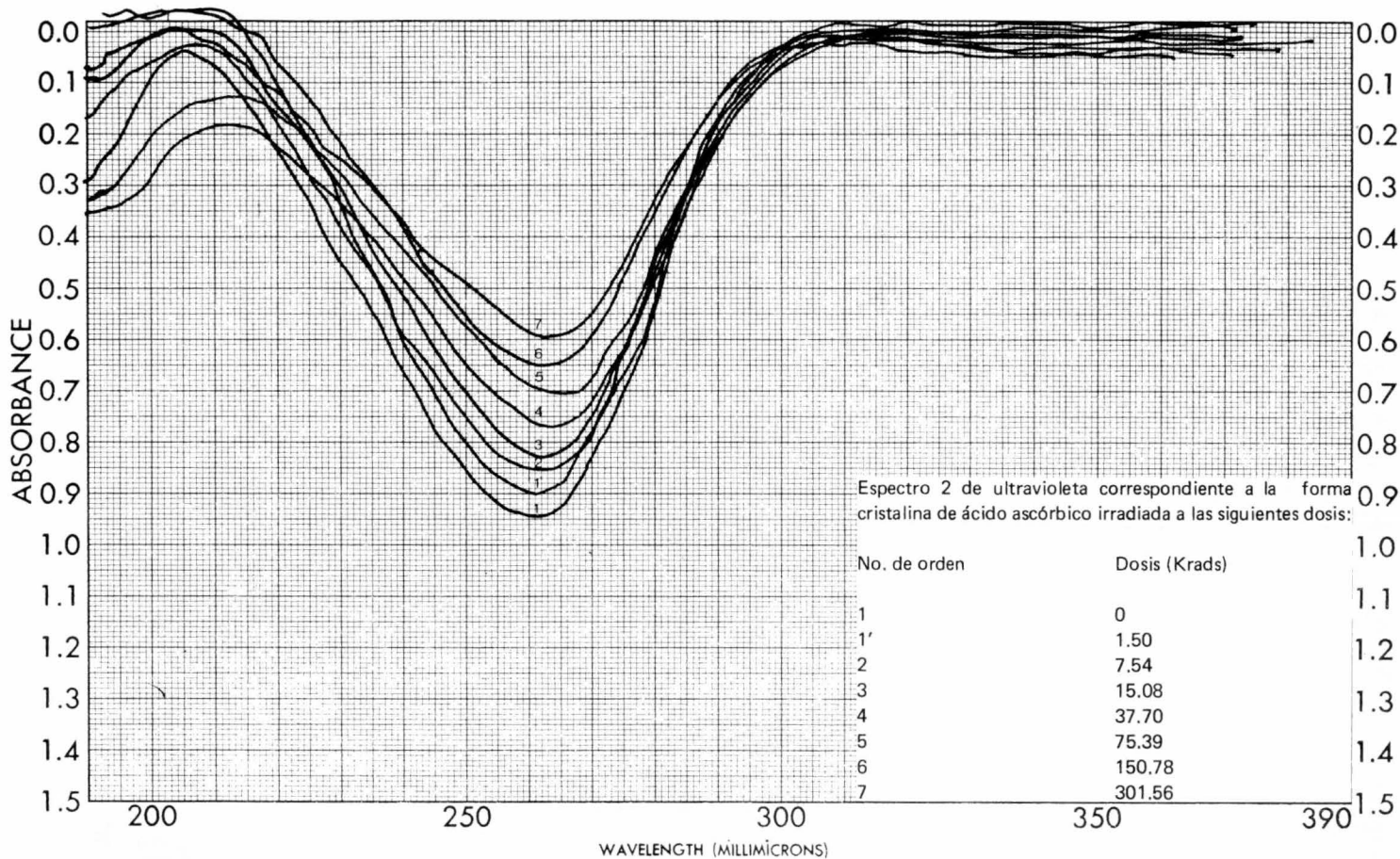
SAMPLE <p style="text-align: center;"><b>Forma normal</b></p>	SOLVENT <b>KBr</b> CONC. _____ CELL PATH _____ REFERENCE <b>Aire</b>	SCAN SPEED <b>Med</b> SLIT <b>N</b>	OPERATOR _____ DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>		

Z 0

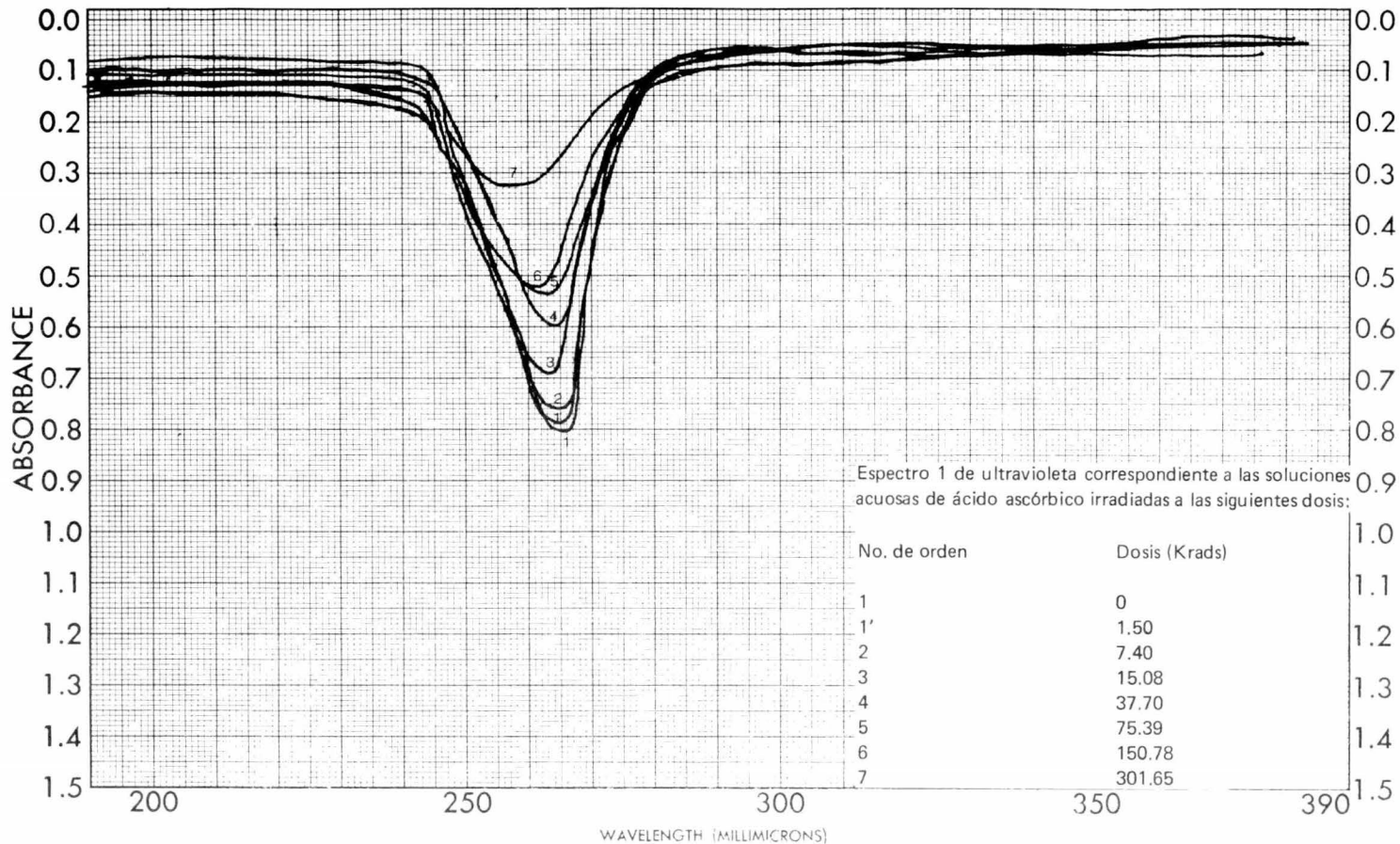


SAMPLE <b>Forma normal</b>	SOLVENT <u>KBr</u>	SCAN SPEED <u>Med</u>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <u>N</u>	DATE <u>6-IX-74</u>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <u>Con atenuador</u>	
	REFERENCE <u>Aire</u>		

Z  
O



SAMPLE _____	CURVE NO. _____	SCAN SPEED <u>Fast</u>	OPERATOR _____
ORIGIN <u>María de Lourdes Pérez G.</u>	CONC. <u>6-2006</u>	SLIT <u>100</u>	DATE <u>5- VIII-74</u>
SOLVENT <u>agua</u>	CELL PATH <u>7-2008</u>	REMARKS _____	
	REFERENCE <u>8-2007</u>		



SAMPLE _____	CURVE NO. _____	SCAN SPEED <b>Fast</b>	OPERATOR _____
ORIGIN <b>María de Lourdes Pérez G.</b>	CONC. <b>6-2006</b>	SLIT <b>100</b>	DATE <b>5-VIII-74</b>
SOLVENT <b>agua</b>	CELL PATH <b>7-2008</b>	REMARKS _____	
	REFERENCE <b>9-2007</b>		

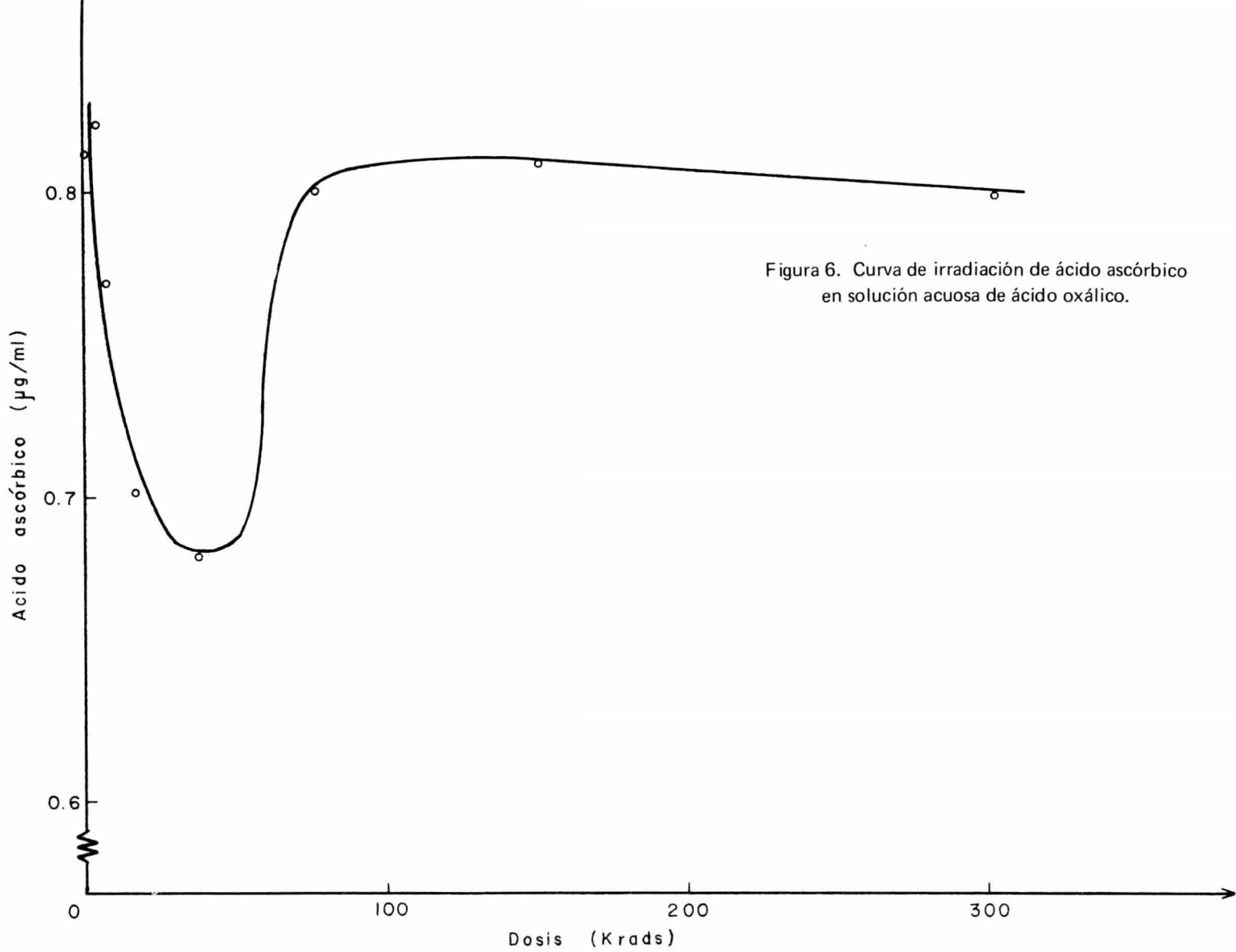


Figura 6. Curva de irradiación de ácido ascórbico en solución acuosa de ácido oxálico.

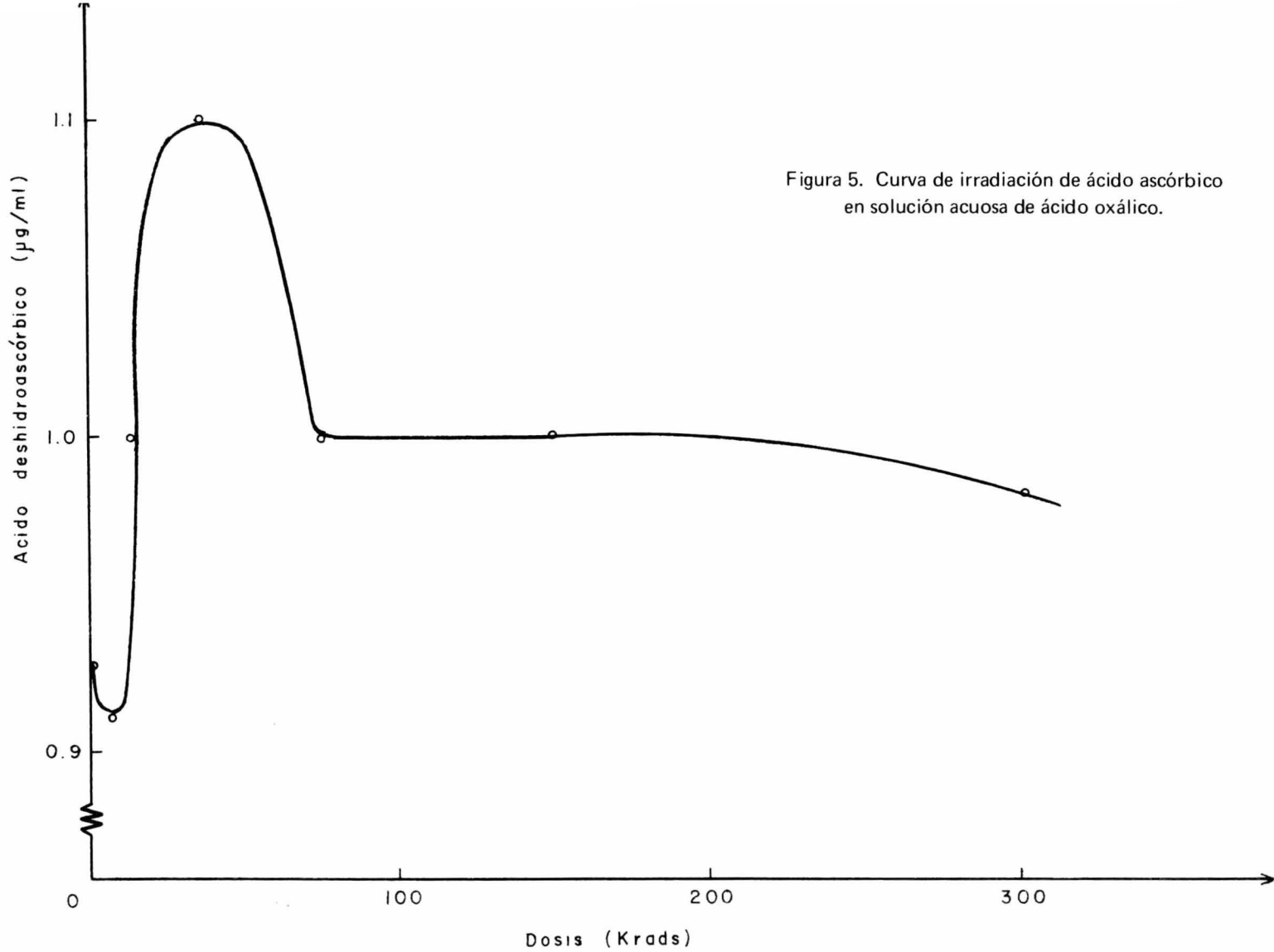
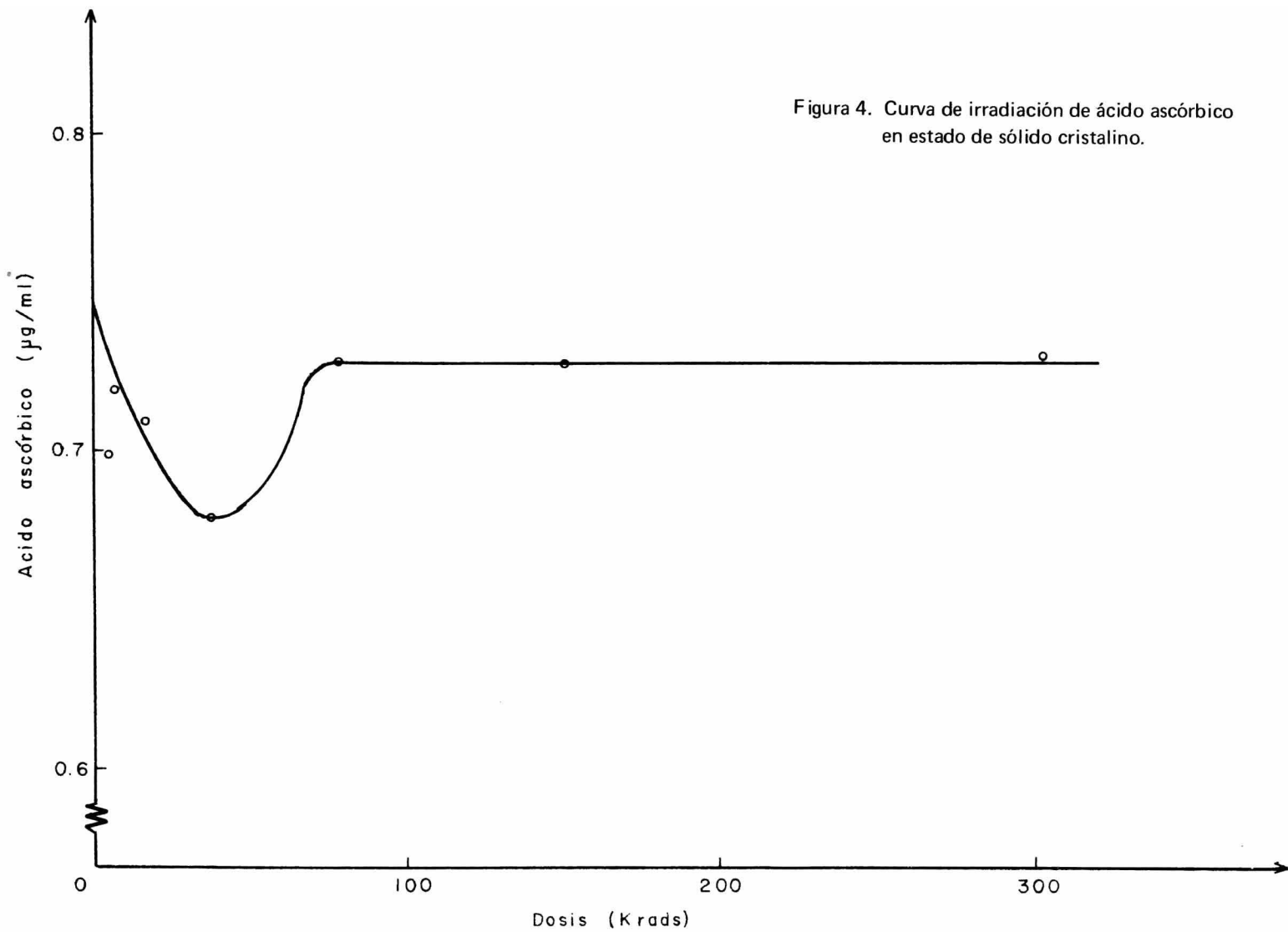
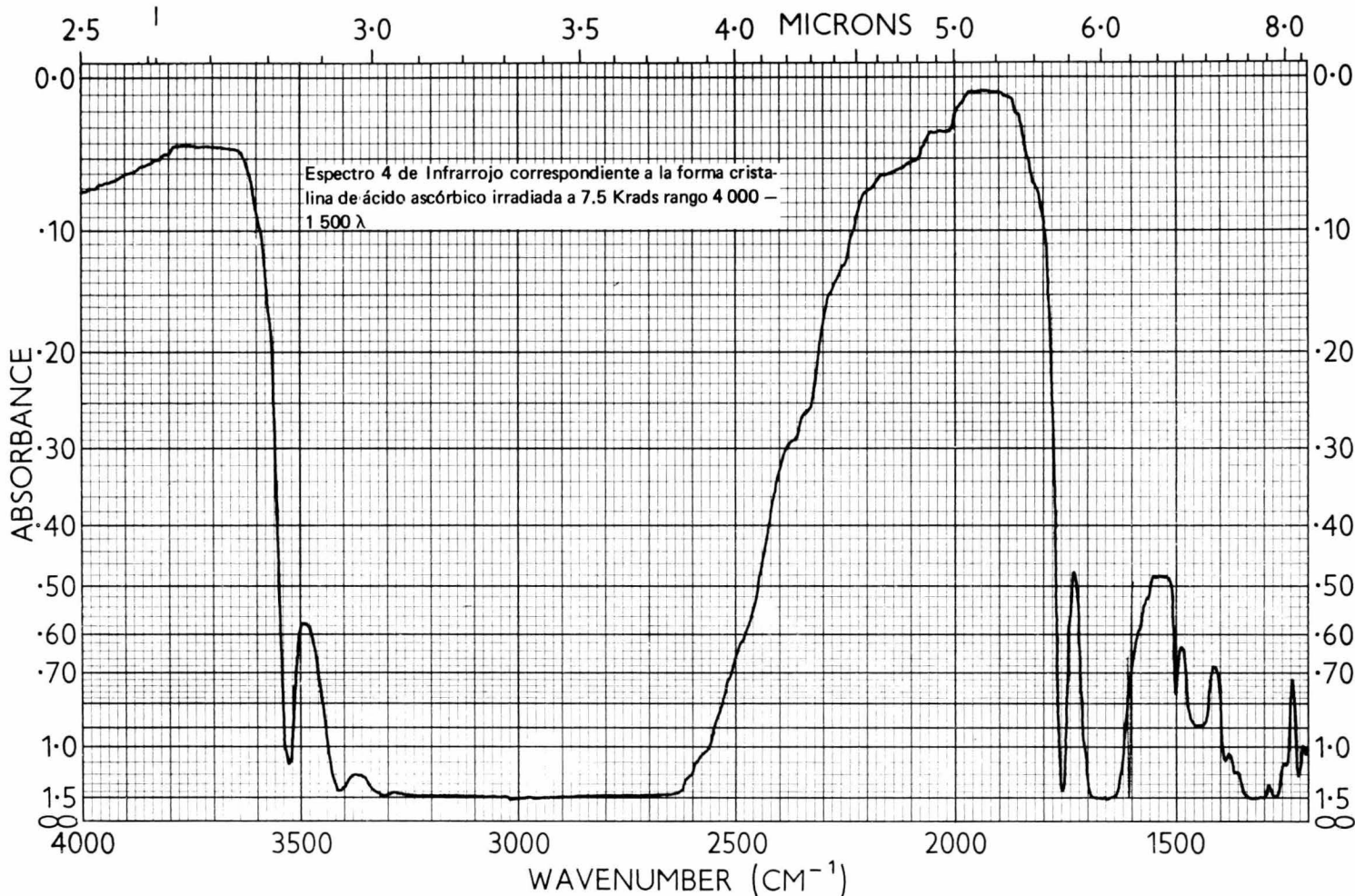


Figura 5. Curva de irradiación de ácido ascórbico en solución acuosa de ácido oxálico.

Figura 4. Curva de irradiación de ácido ascórbico en estado de sólido cristalino.

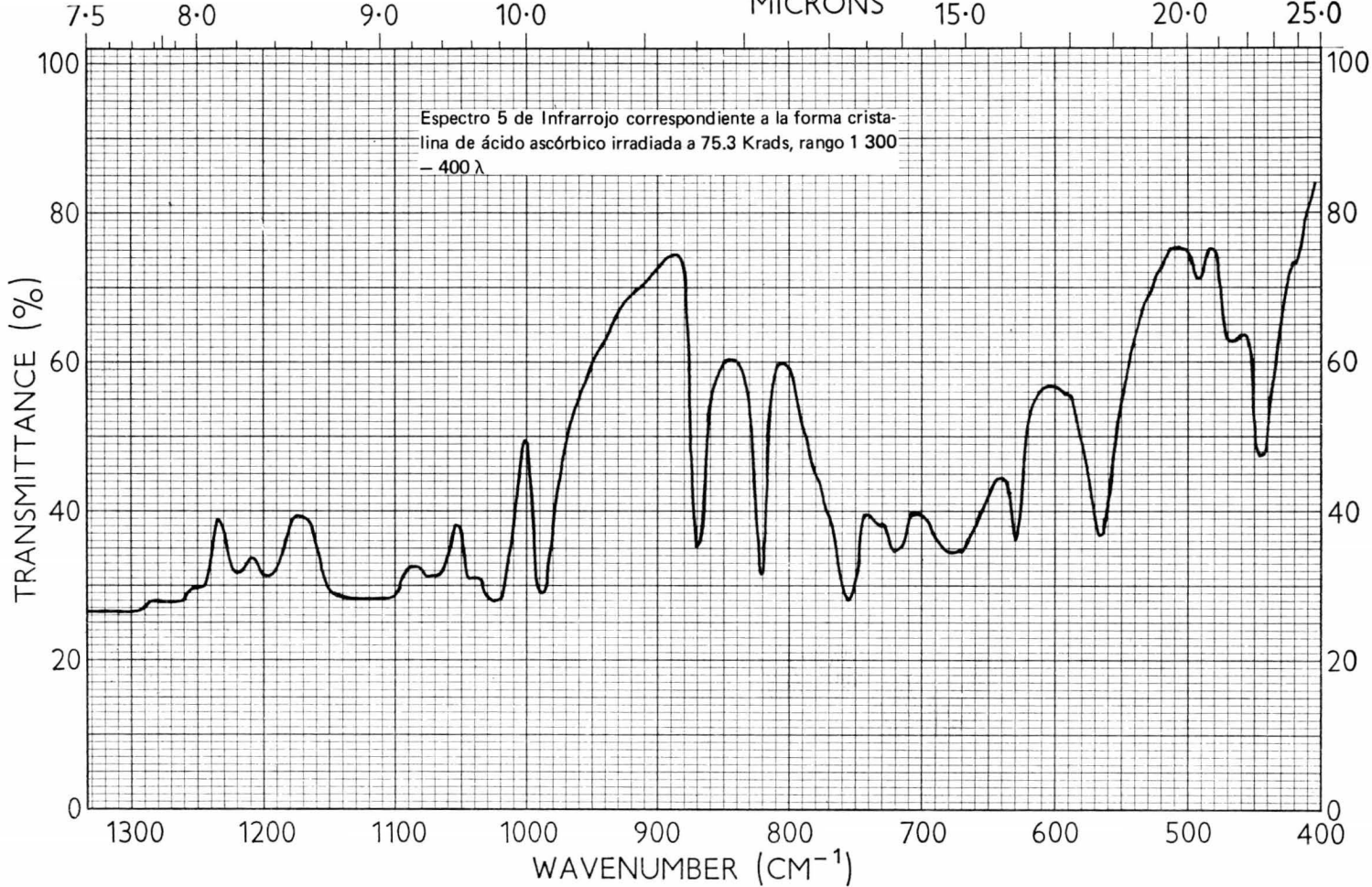






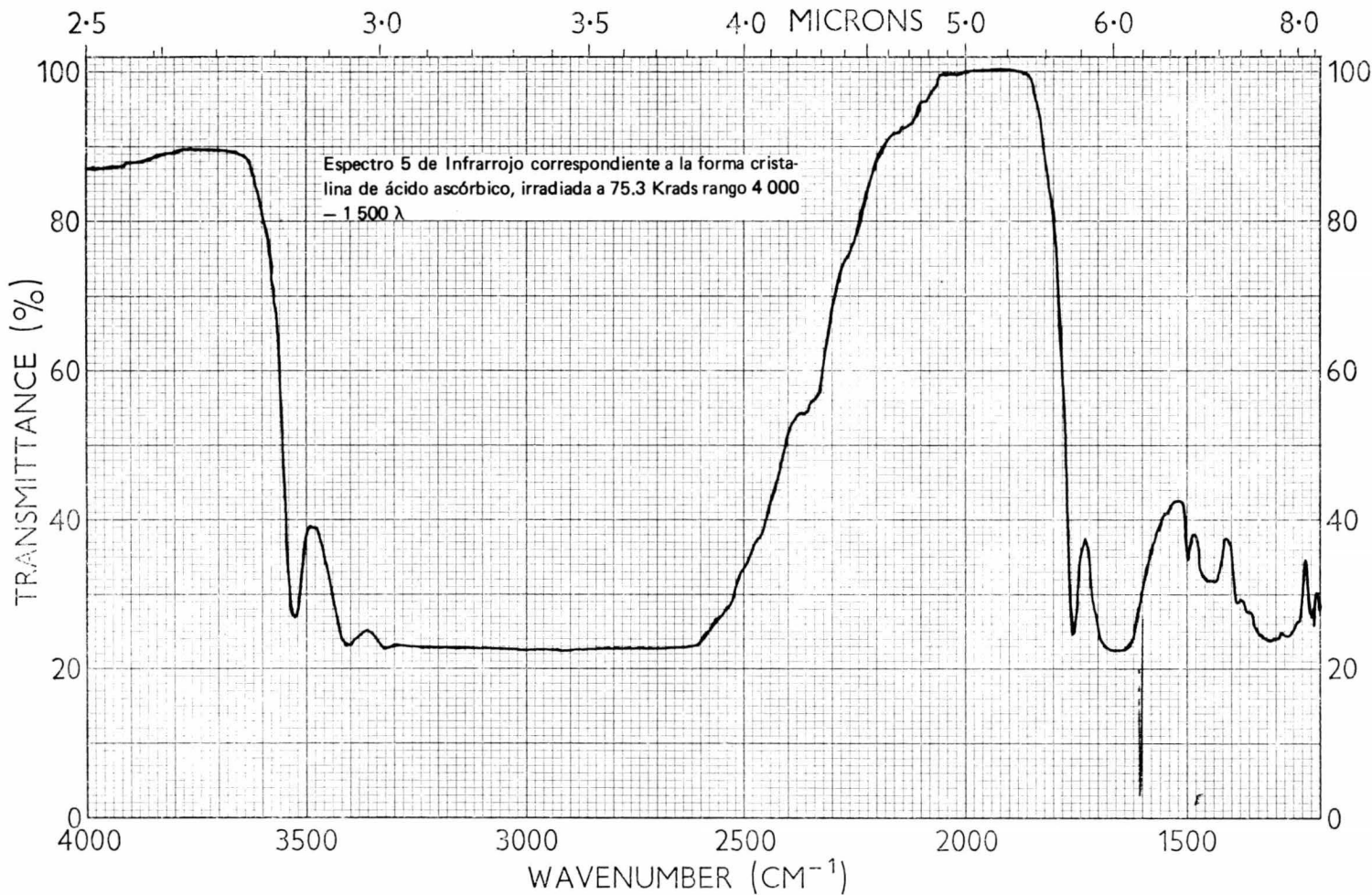
SAMPLE <b>No 2</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>N</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		

Z  
O

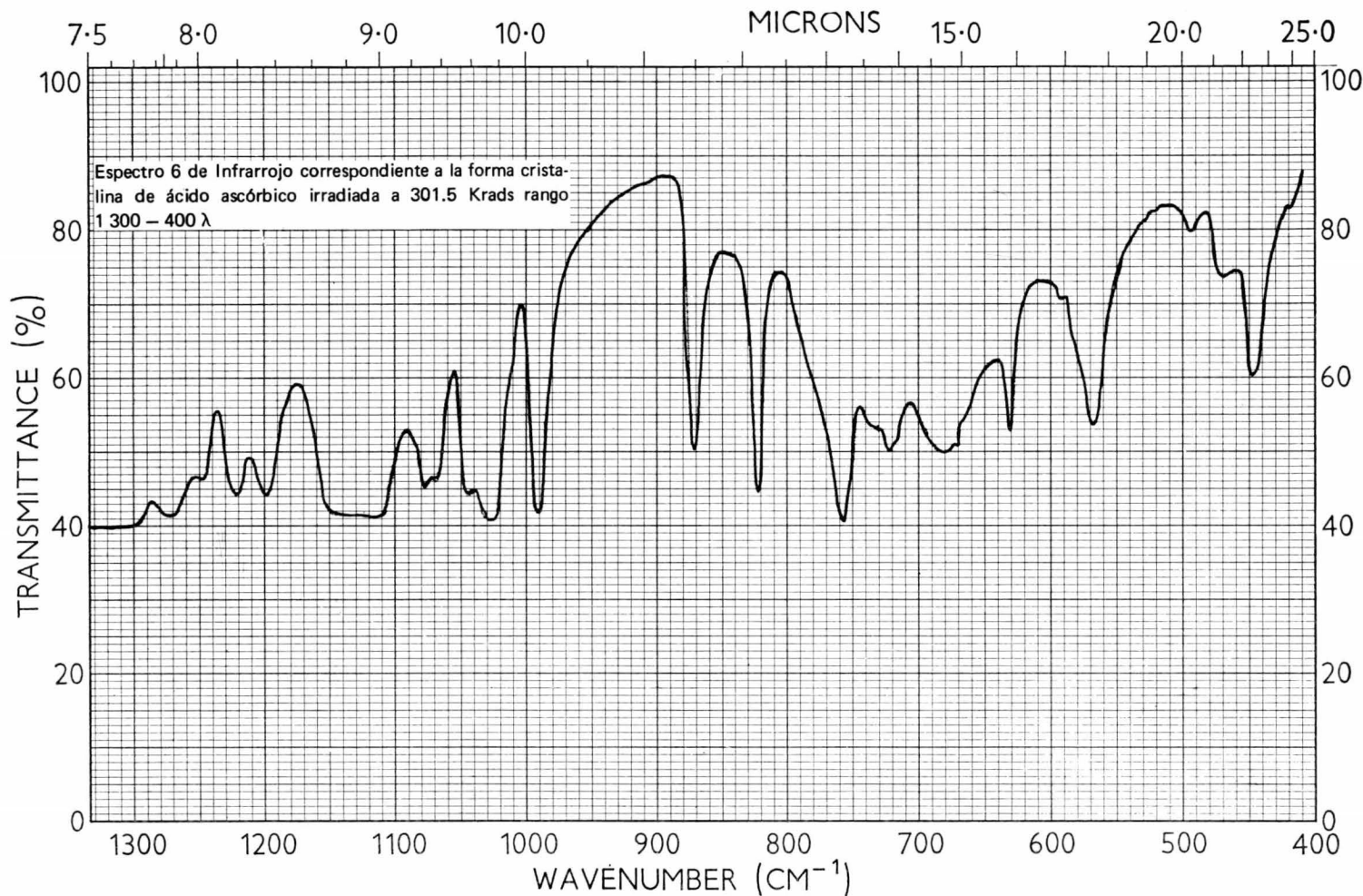


SAMPLE <b>No 6</b>  ORIGIN _____	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>N</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
CELL PATH _____	REFERENCE <b>Aire</b>	REMARKS <b>Con atenuador</b>	

NO

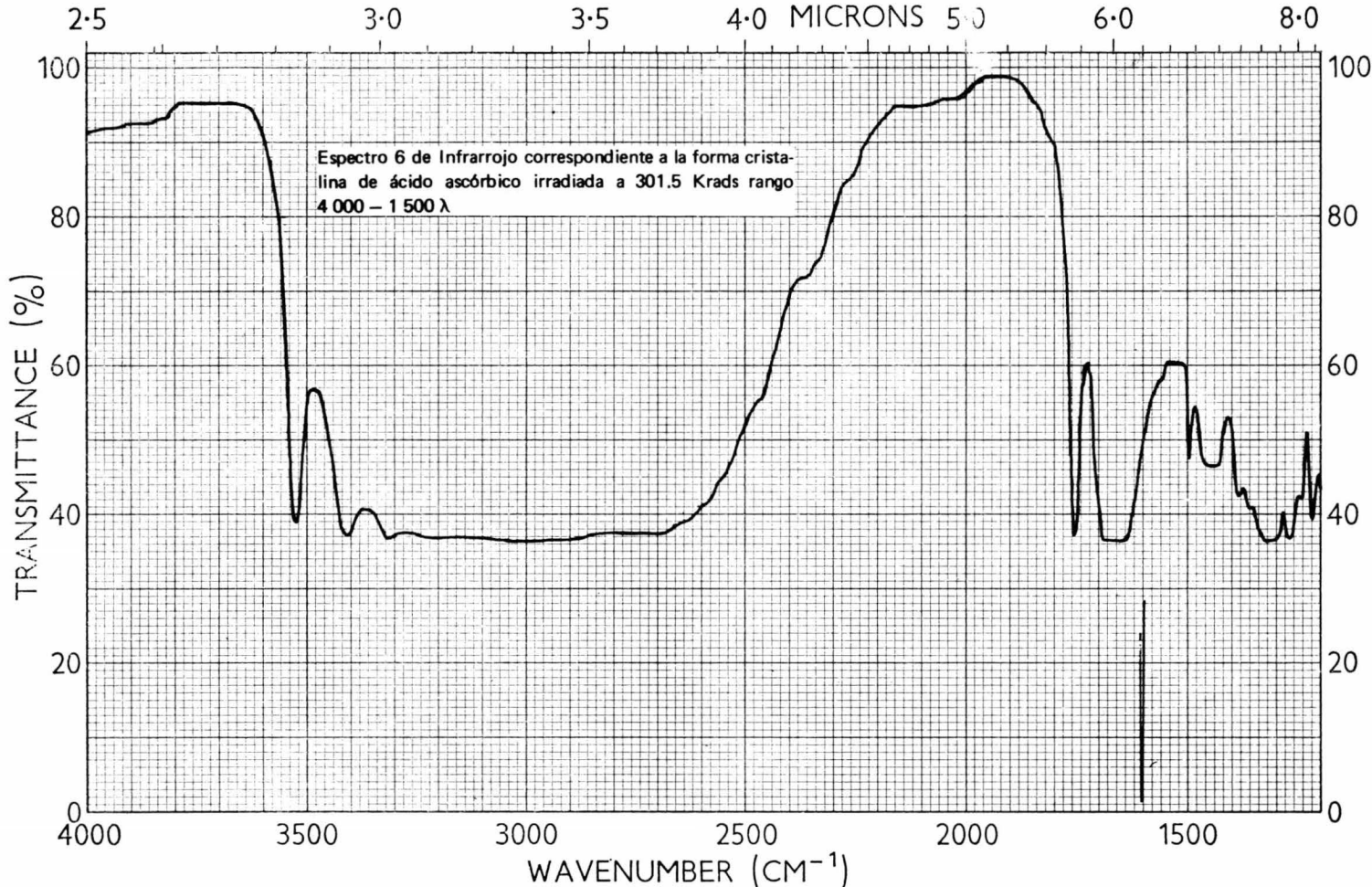


SAMPLE <b>No 6</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
ORIGIN _____	CONC. _____	SLIT <b>N</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		

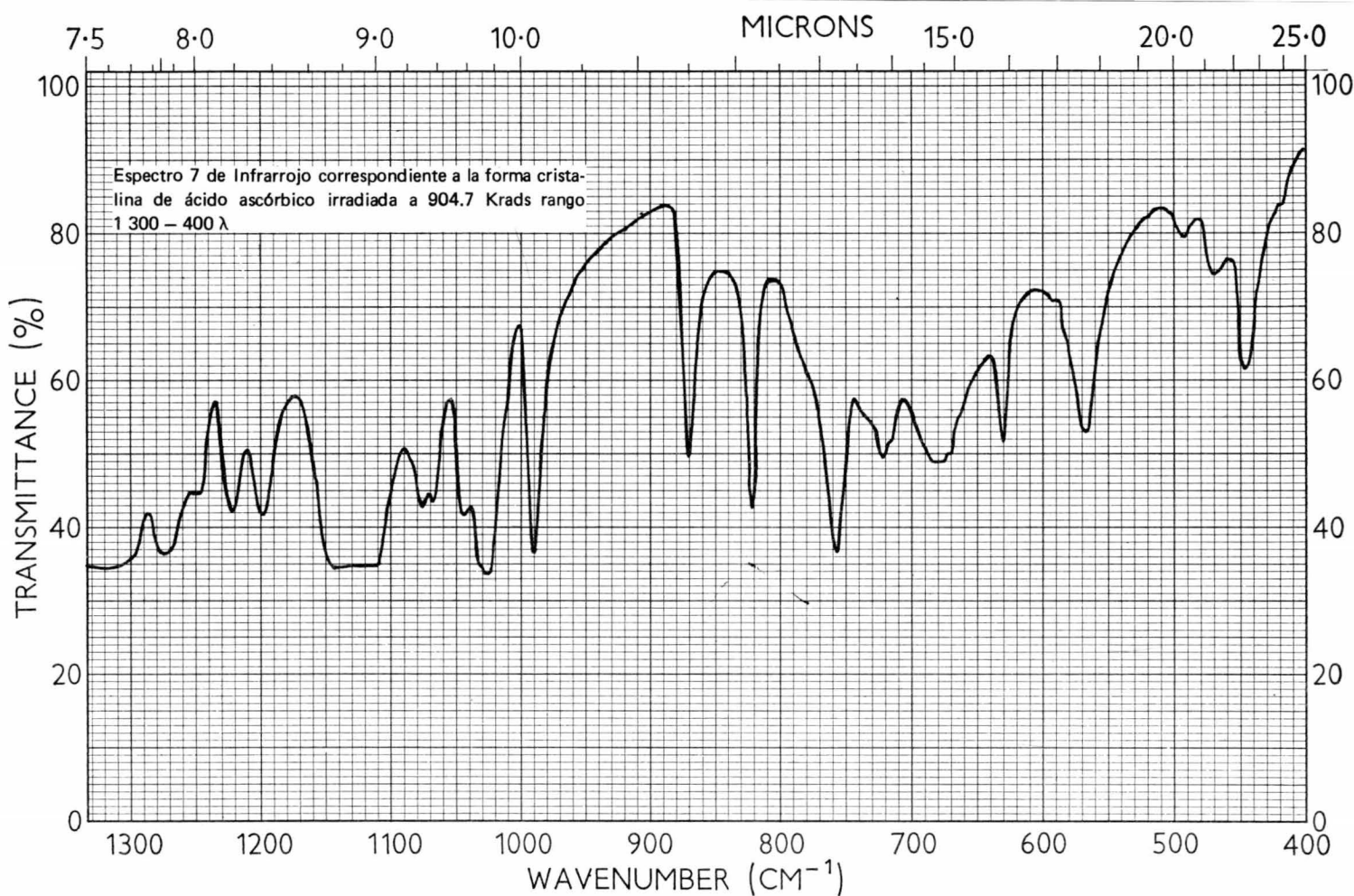


SAMPLE <b>No 8</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>F</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		

NO

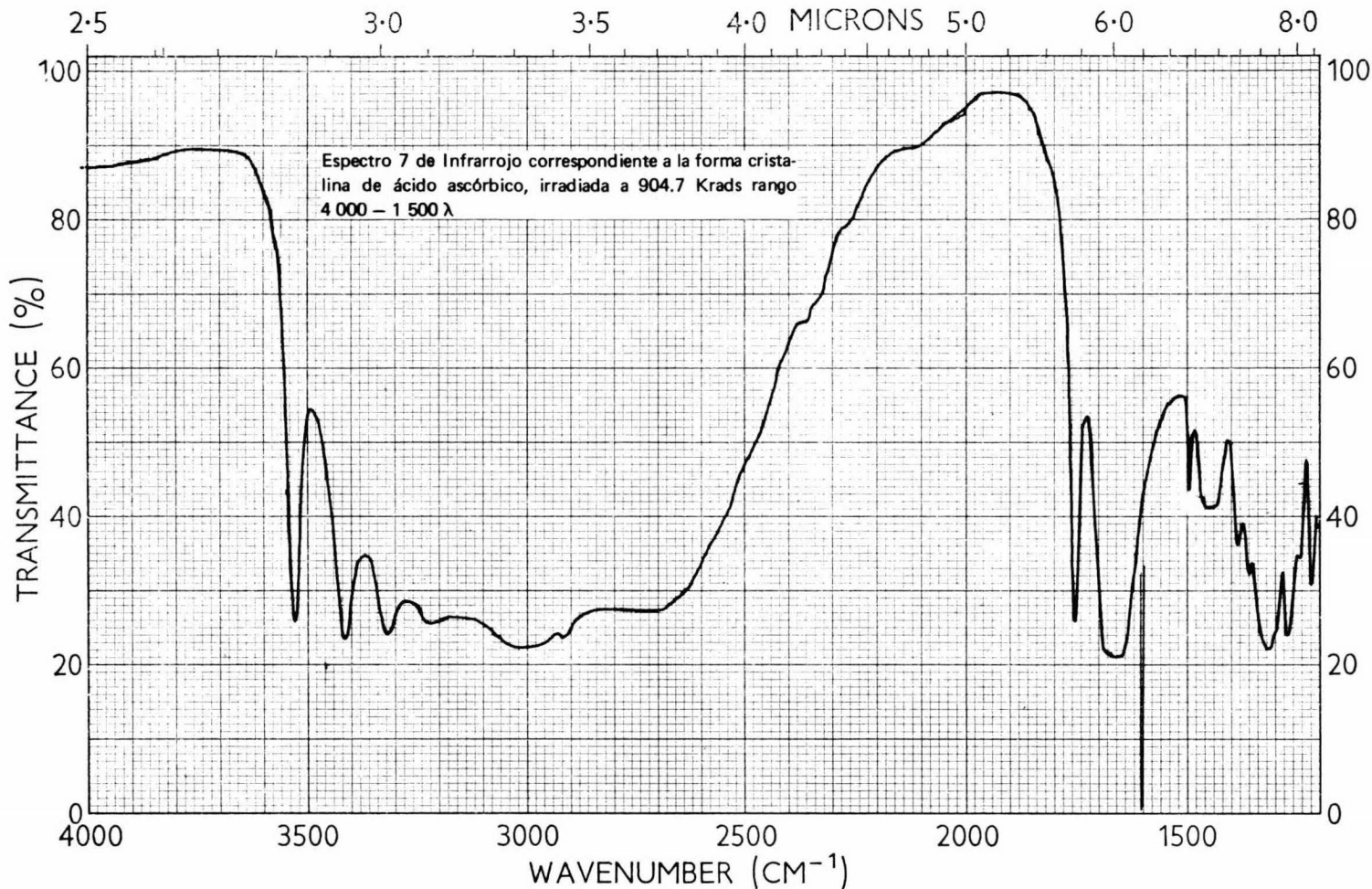


SAMPLE <b>No 8</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>R</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		



SAMPLE <b>No 10</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>N</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		

NO



SAMPLE <b>No 10</b>	SOLVENT <b>KBr</b>	SCAN SPEED <b>Med</b>	OPERATOR _____
	CONC. _____	SLIT <b>N</b>	DATE <b>6-IX-74</b>
ORIGIN _____	CELL PATH _____	REMARKS <b>Con atenuador</b>	
	REFERENCE <b>Aire</b>		

Z O

## Bibliografía

1. Fruton, J. S., Simmonds, S., *Bioquímica General*, Ed. Omega, S. A., Barcelona, 1961.
2. Lehninger, A. L., *Bioquímica*, Ed. Omega, S. A., Barcelona, 1972.
3. Strohecher, R., Heinz, H., *Análisis de Vitaminas*, Ed. Paz Montalvo-Madrid, 1968.
4. Loyola, V. M., et. Al., *Determinación del cambio de ácido ascórbico a dehidroascórbico por efecto de los rayos gamma en papayas*. Rev. Soc. Quím. Méx., 17(6), 1973.
5. Bacq, Z. M.; and Alexander, P. (Editors)., *Fundamentals of radiology*. Academic Press, New York, 1965.
6. Berdjis, C. C.; *Vitamins and irradiation. Some observations and new research perspectives*, Acta Vitamioi Enzimol. 26 (1-2), 23-6 (1972).
7. Hyong, K. S.; Yeum, K. S.; *Rart Kiongtai Storage of irradiated fruits II storage of strawberry*. J. Nuel. Sci. (Seol) 9 (1) (Pt. 2), 111-18, 1969.
8. Toshiharu, K., *Efecto de la radiación gamma en el contenido de ácido ascórbico de fresas y frutas Natsudaikai*. Nogyo Tanki Daigaku Hokoku. 4 (1), 50-4. 1970.
9. Counelle, H.; Et. Al., *Efectos de irradiación en el contenido de vitaminas del grupo B y C en varios alimentos*, An. Nut. Aliment. 24 (3), 41-9, 1970.
10. Guseinov, S. G., *Effect of ionizing radiation on the content of chlorophyle, ascorbic acid, and dry metter in cotton plant leares*. Dokl. Akad. Nauk Azerb. SSR 23 (6), 45-8 (1967).
11. Benedek, L. M.; Istvan, P., *Modification of the Vitamine C control of tomato following.  $\gamma$ -irradiation (Cobalt-60) of the seed*. Agratud egyet Koziem. 237-45, 1969.
12. Thanki, R. J.; Et. Al., *Variation ascorbic acid content and ascorbate oxidase activity during germination dark in  $\gamma$ -irradiated seeds*. indian. Exp. Biol. 7 (4), 277-9, (1969).
13. Roe, J. H.; Kuether, C.A., *The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid*. J. Biol. Chem. 147, 399-407 (1943).
14. M. Freed, *Method of vitamin assay*, 3 ed., John Wiley and Sons, 1966.



15. Roscoe R. Schaffert and Geo. R. Kingsley, *A rapid, simple method for the determination of reduced, dehydro-, and total ascorbic acid in biological material*. (Veterans Admin. Center, Los Angeles, Calif.), J. Biol. Chem. 212 59-68, (1955).

16. Andrew Polk, Thomas L. Flanagan, and Edward J. Van Loon, *Rapid method for determination of ascorbic-acid in urine*. (Smith, Kline and French Labs., Philadelphia, Pa.). Clin. Chem. 6, 558-63, (1960).

17. R. Stohecker. *Analysis of ascorbic acid*. (Fa. E. Merck A.G. Darmstadt, Ger.). Wiss Veroeffentl. Deut. Ges. Ernaehrung No. 14, 157-67 (1964) (Pub. 1965).

18. Joseph. Roe. *Ascorbic acid in blood and urine*. (George Washington Univ., Washington, D. C.). Standard Methods Clin. Chem. (David Seligson, editor, Academic Press) 3, 46-54, (1961).

19. Walter Feldheim and Ruth Schmidt. *Determination of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenolindophenol and of total ascorbic acid (ascorbic acid dehydroascorbic acid) with 2,4-dinitrophenylhydrazine in urine*. (Anstalt Vitaminforsch. u. Vitaminprüfung, Potsdam-Rehbrücke, Ger.). Vitamine u. Hormone 7, 331-7 (1956).

20. Joseph H. Roe and M. Jane Oesterling. *The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in plant tissues by 2,4-dinitrophenylhydrazine method*. J. Biol. Chem. 152, 511-17 (1944).

21. Gordon, J.; Noble, I. *Effect of cooking method on ascorbic acid retention and color differences in vegetables*. J. Am. Dietet. Assoc. 35, 378-81 (1959).