

Tesis de Posgrado

Acido nordihidroguayarético como antioxidante en grasa de leche de vaca

Oestreicher, Bernardo

1947

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Oestreicher, Bernardo. (1947). Acido nordihidroguayarético como antioxidante en grasa de leche de vaca. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0509_Oestreicher.pdf

Cita tipo Chicago:

Oestreicher, Bernardo. "Acido nordihidroguayarético como antioxidante en grasa de leche de vaca". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1947. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0509_Oestreicher.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES .
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICAS Y NATURALES.

T E S I S

presentada por
BERNARDO OESTREICHER
para optar al título
de
DOCTOR EN QUIMICA
- 1947 -

Tesis 519

ACIDO NORDIHIIDROGUAYARETICO

COMO ANTIOXIDANTE

EN GRASA DE LECHE DE VACA.

PALABRAS BREVIAS.

El deterioro de leches en polvo, por fenómenos de destrucción oxidativa es facilitado por su alto contenido en materias grasas y el elevado grado de dispersión de las mismas.

En la literatura se consignan trabajos en éste sentido, con miras a obviar los serios inconvenientes, especialmente desde el punto de vista económico.

El Dr. Pedro Cattáneo me sugirió ensayar el ácido nordihidroguayarético en grasa de leche, como paso previo a su posible utilización como antioxidante en polvo de leches enteras. Desde éste punto de vista ha sido encarado el presente trabajo.

No puedo dejar ésta oportunidad sin expresar mi agradecimiento al Dr. Pedro Cattáneo, padrino de mi tesis, que me secundó en todo momento con su consejo y ayuda; al Dr. R. Brenner por cuyo intermedio me fué posible adquirir el material vegetal necesario para la extracción del ácido nordihidroguayarético y a las autoridades de las Oficinas Químicas Nacionales, en cuyos laboratorios fué realizado el trabajo experimental.

PLAN DE TESIS.

I) Introducción bibliográfica.

1) Inhibidores de oxidación.

A) Inhibidores naturales y artificiales. Antioxidantes no tóxicos.

B) El ácido nordihidroguayarático como antioxidante.

a) El uso del ácido nordihidroguayarático en diferentes productos alimenticios y la producción de sobregustos.

b) Nuevo método de aislación y de síntesis.

2) La rancidez oxidativa y el uso de antioxidantes en algunos productos de lechería.

A) Inhibidores en mantecas y aceite de manteca.

B) Antioxidantes en polvo de leche y la estimación de peróxidos.

II) Parte experimental.

1) Aislación del ácido nordihidroguayarático de Larreas argentinas por el método de Ole Gisvold.

2) Ensayo acelerado por el método de aereación de Swift, de la acción antioxidante del ácido nordihidroguayarático en aceite de manteca.

A) Descripción del aparato de aereación y del termóstato.

B) Standardización del aparato. Curvas representativas. Técnica y métodos.

C) Curvas representativas del proceso oxidativo con diferentes concentraciones de ácido nordihidroguayarático.

3) Ensayo de la acción inhibidora de oxidación del ácido nordihidroguayarático en mantecas en condiciones ambientes.

4) Ensayo de la acción antioxidante del ácido nordihidroguayarático, a diferentes concentraciones con la variación de la concen-

FOYSA

tracción de diacetilo, en mantecas artificiales.

III) Conclusiones.

—

I) INTRODUCCION BIBLIOGRAFICA.

1) Inhibidores de oxidación.

La rancidez en las materias grasas se debe a causas bien conocidas, como ser: absorción de olores, acción de enzimas, acción de microorganismos y acción oxidativa del aire. Siendo las más importantes las dos últimas.

Se ha propuesto, para atenuar las alteraciones en dichas sustancias: a) por enzimas y microorganismos: 1) llevar a temperaturas suficientemente altas; 2) agregar sustancias que paralizan sus efectos y b) por acción del oxígeno: 1) agregar ciertos compuestos que inhiben su acción; 2) envasamiento en atmósfera de nitrógeno ó a presión reducida.

Se conoce y se tiene en cuenta la acción aceleradora de los rayos ultravioletas de la luz solar (1)(2), trazas de ciertos metales como cobre e hierro principalmente (1)(2)(4), de la humedad y del contenido en agua (1) y de los mismos peróxidos.

El uso de ciertas sustancias para conservar materias grasas, se remonta muchos años atrás. En 1843 Deschamps descubrió que el benjuí aumentaba la conservación de la grasa de cerdo y desde entonces se hizo general su uso con tal fin, sobre todo en productos farmacéuticos. Chevreul en 1856 conocía que el roble y otras maderas demoraban el secado del aceite de lino.

Los indios norteamericanos usaban corteza de árboles para retardar el desarrollo de la rancidez en grasa de oso. Como se vé, estos eran medios empíricos de incorporar sustancias fenólicas en las grasas.

Moureau y Dufraisise (5) encontraron que muchas sustancias

eran capaces de retardar la oxidación atmosférica en las grasas, como algunos fenoles y sustancias orgánicas nitrogenadas. En esto se basaron los numerosos trabajos posteriores para impedir el enranciamiento oxidativo de las materias grasas, problema de gran importancia biológica y económica.

A) Inhibidores naturales y artificiales. Antioxidantes no tóxicos.

La primera indicación experimental de la existencia de inhibidores naturales en grasas fué hecha por Mattil, quién comprobó que suministrando vitaminas E y A en dietas, se retardaba su destrucción, cuando en vez de suministrarlas solo con grasas animales como lardo o aceite de hígado de bacalao, se agregaba porciones de aceites vegetales de igual o mayor no saturación (1).

Trabajos posteriores demostraron que estas vitaminas en asociación con inhibidores presentes en tejidos vegetales, debían su mayor poder de resistencia a la destrucción oxidativa en medios anteriormente favorables, a la presencia de pequeñas cantidades de sustancias a las que se llamó antioxidantes, inhibidores de oxidación y antioxígenos.

Más tarde Hilditch demostró que los glicéridos resintetizados de ácidos grasos destilados de muchos aceites naturales, eran mucho menos resistentes a la oxidación que estos mismos aceites(1).

Los procesos de fabricación y elaboración, como ser: tratamiento con álcalis, refinación, agentes de decoloración y aereación a altas temperaturas, llevan a una reducción pronunciada en el potencial de resistencia a la oxidación.

Mattil y Crawford encontraron que la propiedad antioxidante del aceite crudo de germen de trigo y de maíz está radicado en la

porción insaponificable (que constituye alrededor del 2 % del total) y lo utilizaron por primera vez para mejorar la resistencia a la oxidación de algunas grasas o aceites menos estables.

La acetilación de estas fracciones destruye completamente su actividad, que podía ser devuelta por subsiguiente hidrólisis, como también por otros reactivos que actuaban sobre los grupos hidroxilos. Se les dió el nombre de inhibitoles. Recientemente Ulcott(6) llegó a la conclusión de que ésta propiedad antioxidante se debe en gran parte a los tocoferoles.

Parece indispensable para la actividad antioxidante de un compuesto específico, que los grupos hidroxilos estén directamente substituidos en un núcleo aromático en posición orto o para. Núcleos hexametilénicos hidroxilados por ejemplo, son inertes, como lo son el ácido orto y para-hidroxibenzoico y el alcohol orto-hidroxibenzoico.

Los inhibidores estudiados se dividieron en tres grupos: 1) el tipo ácido, 2) los inhibitoles y la hidroquinona y 3) el tipo fenólico, incluyendo: alfa-naftol, pirogalol, catecol y otros (1).

Recientemente Mattil (7)(8) propuso su división en dos grandes grupos: antioxidantes (substancias fenólicas) y sinérgicos (ácidos, generalmente orgánicos, di o polibásicos).

Esta clasificación se basa en cuestiones de orden cinético; el peróxido graso formado es reducido por el antioxidante, rompiéndose la cadena de autooxidación; el sinérgico que tiene un potencial de oxidación menor que el antioxidante propiamente dicho, actúa como reservorio de hidrógeno, transfiriéndolo por intermedio del antioxidante al peróxido activado.

Cabe hacer aquí una gran selección, ya que el problema a estudiar se concierne a materias grasas comestibles, y un gran número de antioxidantes son tóxicos, ingeridos en cantidades, como ser algunos del tipo polifenólico y amínicos, aunque en realidad una pequeníssima cantidad agregada no hace pensar en una acción más tóxica que algunos constituyentes naturales de alimentos.

Oloovitch y Kattil (9) alimentaron ratas por varias generaciones con dietas de grasas y aceite de vitaminas estabilizadas con hidroquinona, sin notar efectos tóxicos aparentes. Sin embargo por falta de datos más efectivos de la no toxicidad, estas sustancias no son utilizadas actualmente en alimentos. Ellas han encontrado sin embargo otros usos, aunque limitados, como ser en sustancias grasas no comestibles, jabones, aceites minerales, caucho, naftas, etc.

Las normas que en resumen deben de ser tenidas en cuenta (10) para la elección de un antioxidante eficiente en un producto alimenticio son:

- 1) El antioxidante tiene acción máxima en alimentos manufacturados, cuando está incorporado en la grasa, es decir debe ser suficientemente soluble en la grasa o aceite.
- 2) El aceite mismo debe tener propiedades antioxidantes.
- 3) Una mezcla de dos tipos de inhibidores debe emplearse, ácidos y fenólicos, desde que juntos son más activos que individualmente (tocoferoles, hidroquinonas y compuestos relacionados con el ácido ascórbico (11); tocoferoles, ácido nordihidroguayarático, galato de etilo con ácido cítrico, palmitato de ascorbilo o lecitina(12); tocoferoles con ácido cítrico o tartárico(13); ácido

nordihidroguayarático, resina de guayaco con ácido fosfórico o cítrico(14); ácido nordihidroguayarático con fosfolípidos(15) .

- 4) Aparte de su acción sinérgica, los dos tipos deben estar presentes en un antioxidante sin uso específico, ya que el tipo ácido es más efectivo en grasas y aceites vegetales que en aquellas de origen animal. Lo contrario es verdad para el tipo fenólico.
- 5) Los antioxidantes y sus vehículos deben ser sustancias naturales no tóxicas, aceptadas por el código bromatológico, sin influencia dietética sobre el gusto, consistencia natural y color de la sustancia alimenticia.

Desde las comprobaciones de Mattil y Crawford, múltiples estudios y sugerencias fueron hechas para utilizar los antioxidantes naturales presentes en aceites crudos y tejidos vegetales, dando origen a una gran cantidad de patentes. Vamos a citar a continuación los principales antioxidantes usados en productos comestibles.

El primer motivo de patente fué el uso de la lecitina (fracción fosfolípida del aceite de soja), en el año 1923.

Grettie y Newton patentaron la adición de 5 a 10 % de aceite de sésamo (hidrogenado a una determinada consistencia), a manteca de cerdo, grasa vacuna y mantequillas, y de aceite crudo de semilla de algodón a aceite refinado y lardo (1). Estos mismos autores propusieron el uso de resina de guayaco, que se extrae de un árbol originario de Centro América e Islas del Mar Caribe, el "Guaiacum Officinale" (14).

Musher (14)(1), con una serie de patentes que comienzan en el año 1936, da a conocer el uso de: flores desecadas y finamente molidas de avena (AVENEX), de cebada o de soja; semillas trituradas

de sésamo, maní; tortas de semilla de lino; gluten de trigo y granos verdes de café.

Las flores de cereales son recomendadas para aceites vegetales; y para la generalidad de los usos las flores de avena son preferidas por ser incoloras y por su suave aroma. Además parecen ser más efectivas que las de soja.

Estos polvos deben ser a veces decolorados al sol (por ej. para usar en lardo), o extraídos con solventes a fin de evitar interferencias con el gusto y aroma natural, perdiendo con ello bastante poder de su actividad antioxidante. Tratando de subsanar este defecto y ampliando su campo de acción, se trató de extraer de estos tejidos molidos, fracciones activas tratándolas con solventes adecuados, como alcohol, acetona, etc.(16), obteniéndose una goma viscosa, cuya naturaleza química es aún ignorada. La fracción más activa es la correspondiente a la fosfolípida y al extracto alcalino (17).

Las flores de avena molidas pueden ser incorporadas directamente a manteca de cerdo y mantequillas a usar para hornear o freír, así como también en margarins, ice-cream, mayonesas y aceites de mesa para ensaladas. Otros productos son espolvoreados o untados exteriormente: tocino, nueces saladas, sebo y ciertos pescados. Un medio muy ingenioso y práctico es encolar el papel de la envoltura y espolvorearlo o mejor incorporar el antioxidante en la parafina con la cual se habrá de impermeabilizar. Una patente reciente de Musher(18) prescribe embeber el papel con una solución de antioxidante, cubriéndolo con una capa de barniz, parafina o aceite refinado de hidrocarburos.

En el año 1939 proponen diferentes investigadores el uso del

ácido ascórbico, cuyas propiedades fueron estudiadas por Columbia.

Este mismo autor estudia por el método de absorción de oxígeno las propiedades antioxidantes de derivados pirónicos (19) (hidroxicromanos e hidroxicumaronas).

Unos años después a raíz de estudios sobre constituyentes de plantas realizadas por la Universidad de Minnesota y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, se ensaya y se verifican las propiedades antioxidantes del ácido nordihidroguayarático.

B) El ácido nordihidroguayarático como antioxidante.

a) El uso del ácido nordihidroguayarático en diferentes productos alimenticios y la producción de sobregustos.

Desde que Halvorson y Lauer reconocieron sus excelentes propiedades como inhibidor de oxidación del lardo (20), numerosos ensayos para probar esta acción en diferentes productos alimenticios se hicieron con este compuesto fenólico.

El NDGA (marca registrada para designar este compuesto), es fabricado hoy en día en escala industrial por Wm. J. C. Stange y Cía., con licencia de patente Nº 2.382.475 (1945); 2.408.924 (1946) (27) y patentes accesorias (°). Su precio de venta oscila actualmente alrededor de 50 dólares la libra. Como está demostrada su naturaleza inofensiva (21), su uso ha sido aprobado por la División de Inspección de Carnes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Meat Inspection Division), estableciendo su agregado hasta 0,01 %. Propaganda comercial de esta compañía (22), recomien-

(°) Dirección: Nordigard Corp., 2536 West Monroe Str., Chicago 12, Illinois.-

da su uso en: aceites y grasas en general, semillas de guisantes, pulpa de semillas secadas o asadas, leche en polvo o envasada, ice-cream, lardo, queso, pescados, aceites de vitaminas, preparados farmacéuticos, condimentos con aceites, mayonesas, alimentos congelados, leche malteada, etc.

Smith, Brady y Comstock (23), hicieron ensayos prácticos de aumentar el período de conservación del tocino ahumado. Para esto sumergieron tajadas de tocino en aceite con antioxidante y las colgaron, unas, frente a ventanas, y otras en la obscuridad. Calentando y comprimiendo las tajadas, utilizaban la grasa fundida para determinar los respectivos índices de peróxido.

Otros ensayaron este compuesto en ciertos pescados (24) curados con sal, sumergiéndolos en una solución al 0,2 % de NDGA en aceite. Los resultados son mejores agregando 0,1 % de ácido benzoico o vainillato de etilo. El tiempo de conservación apto para consumo se elevó a 5 meses con respecto a los no tratados.

En la estabilización de aceites de caroteno (15), uno de los más efectivos demostró ser el ácido nordihidroguayarático, acentuando con fosfolípidos o ácido cítrico, además del ácido gálico.

Una de las condiciones esenciales de todo buen antioxidante es no variar los caracteres organolépticos de la materia grasa a la cual se agrega, es decir no impartirle gustos u olores objeccionables. En general, pocos investigadores han tenido en cuenta esta cuestión. Aunque Viobin manifestó que el NDGA no imparte olores y gustos objeccionables a los aceites, Coulter encontró que la adición de NDGA o resina de guayaco causa sobregustos y especialmente olores a leches en polvo (25).

Higgins y Black (26), notificaron de que el NDGA no imparte olores ó gustos objeccionales a aceites frescos desodorizados, pero que con el estacionamiento ó incubación un gusto metálico desagradable es a veces notado. Traen datos de resultados obtenidos por adición de NDGA a lardo y aceites vegetales, por medio de una solución alcohólica ; estos demuestran que es más efectivo en grasa animal.

b) Nuevo método de aislación y de síntesis.

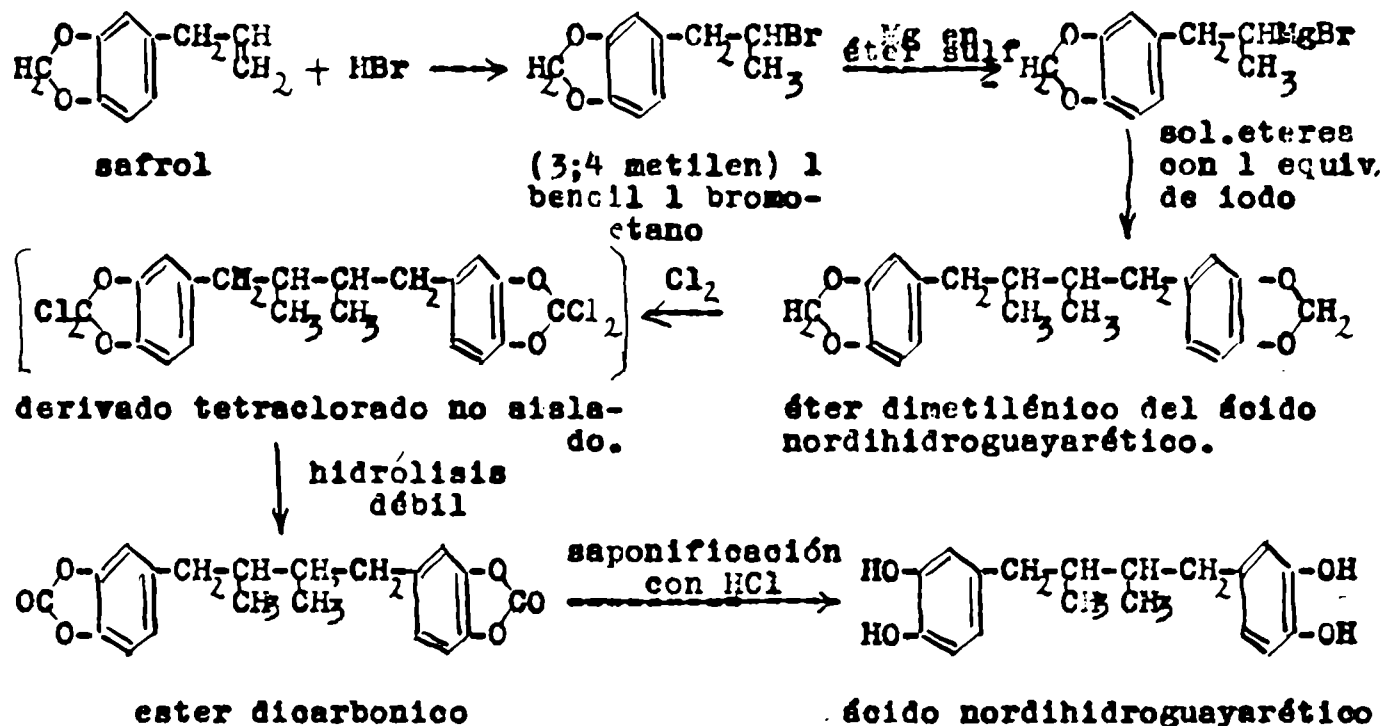
Los primeros ensayos de extracción del ácido nordihidroguayarático, realizadas en Estados Unidos, fueron las tesis de C. E. Waller y G. M. Horn presentadas a la Universidad de Minnesota (20).

Ole Gisvold autor del primer método práctico de extracción en escala de laboratorio, (ver parte experimental), dió a conocer un nuevo método de aplicación industrial (27). Consiste en percolar ó extraer una determinada cantidad del material vegetal (hojas y tallos pequeños de *Larrea Divaricata* Cav.), con éter etílico, reducirlo diez veces en volumen, enfriar y separar las ceras por filtración. El filtrado vuelto a concentrar, y luego de agregar unos volúmenes de dicloroetileno, es calentado en baño maría hasta nueva reducción de volumen. Enfriando tiene lugar la cristalización, que es completa en 24 a 48 horas. Se hace constar que las cristalizaciones del NDGA de soluciones de alcohol ó éter etílico no dan resultado pero que disolventes del tipo de hidrocarburos clorados (cloroformo, dicloro-propileno;-etileno;-metileno) son satisfactorios para separar el NDGA de impurezas naturales.

A la primera síntesis del ácido nordihidroguayarático en el año 1918, por la cual fué establecido su estructura (20), sigue re-

cién ahora un nuevo método sintético, sin duda a raíz del interés despertado por sus propiedades antioxidantes.

S. V. Liebermann y colaboradores (28), en Estados Unidos, partiendo del safrol, obtienen de una manera elegante dicho compuesto. Consiste, resumiendo en los siguientes pasos:



Cristales de este compuesto, mezclados con una muestra de NDGA procedente de la casa Nordigard Corp., no mostró disminución del punto de fusión.

La unión de dos moléculas del (3;4 metileno dioxi) 1 bencil 1 bromoetano con sodio ó polvo de zinc en benzol y copper-bronze en decalina no llevó a resultados positivos.

2) La rancidez oxidativa y el uso de antioxidantes en algunos productos de lechería.

La grasa de leche por su origen y su composición, es factible

de adquirir muchos olores y sobregustos, originados ya sea por sus enzimas lipolíticas propias o la de microorganismos extraños.

El oxígeno del aire produce en la grasa de leche vacuna gustos oxidados y rancios, que limitan su período de consumo. Su resistencia a la oxidación depende del alimento del animal; pastos verdes, ciertos forrajes, zanahorias o soja disminuyen la tendencia de producir rancidez. El contenido en carotenos, fosfolípidos, y otras sustancias susceptibles de variar el potencial de oxidación, son la causa de estos cambios (1).

Por lo general los gustos oxidados en la grasa de leche se deben a contaminaciones con trazas de cobre y menos frecuentemente al hierro. Leche conteniendo 1,5 partes de cobre por millón, origina un gusto oxidado en 24 horas a una temperatura de 0 a 5°C, dando un producto seco que contiene 10 a 15 partes de cobre por millón, volviéndose éste rancio más rápido durante el almacenaje(29). Recomiéndase hoy por lo tanto el uso de recipientes de acero inoxidable en la manufactura y elaboración de productos de lechería.

Los productos derivados de la grasa de leche vacuna, que se expenden en el comercio, se pueden clasificar en dos categorías: unos de consumo más o menos rápido, y otros en que se trata de aumentar en lo posible el período de conservación^o de consumo. En esta categoría entra el aceite de manteca y el polvo de leche entera.

A) Inhibidores en mantecas y aceite de manteca.

La manteca por su contenido en agua (16 a 19 %) (30), es factible de descomposición y deterioro por numerosos microorganismos

especialmente hongos.(1). La pasteurización de las cremas, la limpieza en su elaboración y empaque y su almacenamiento en frío, limitan la destrucción por esta causa. Los factores dominantes que aceleran el deterioro químico son: la presencia de trazas metálicas, acidez (31), alto contenido de sel y de aire.

El aroma de la manteca hecha de crema fresca, es suave y agradable y es acentuado por la maduración de la crema. Para lo cual se agrega un cultivo adecuado de bacterias, anterior al batido. El aroma y gusto característico de la manteca obtenida de esta manera es debido principalmente al diacetilo: $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$, que con el acetil-metil-carbinol: $\text{CH}_3\text{-CO-CHOH-CH}_3$ es formado por las bacterias durante la maduración. La concentración de diacetilo en mantecas es de 0,5 a 5 partes por millón (32). Este compuesto desaparece completamente con el tiempo, aunque para temperaturas de 20°C (el diacetilo hierve a 88-89°C) en que la deteriorización de la manteca es bastante rápida, es retenido por largos períodos (33)(34).

Algunos datos han llevado a la conclusión de que el diacetilo por sí tiene propiedades prooxidantes. Muestras de aceite de manteca, enriquecidas con gran exceso de diacetilo, se vuelven rancias más rápidamente que los testigos (1)(35). Margarina, cuyo aroma y gusto ha sido mejorado por la adición de diacetilo y mantecas con alto contenido de esta cetona, se vuelven sebáceas en menor tiempo (1).

Respecto al uso de inhibidores en mantecas, es en realidad una aplicación especial de los conceptos expuestos anteriormente. Tal es que todas las patentes de Kusher citan la aplicación de tal

o cuál antioxidante en grasa de leche. Su incorporación puede lograrse, agregándolo a la manteca previamente al batido y emasamiento.

Como novedad puede citarse el uso de flavonas y derivados en grasa de leche y lardo (36). Quercitina incorporado en un 0,015 a la grasa, extiende el período para llegar a 5 miliequivalentes de agrupación peróxido por kg de grasa de leche, o a 10 mequiv. de peróxido para lardo (considerados como valores correspondientes a una rancidez incipiente), de 30 a 144 horas para la primera y de 26 a 96 horas para el segundo. Las determinaciones de los caracteres organolépticos, especialmente el gusto, no revelaron la presencia del antioxidante agregado.

Respecto al aceite de manteca, su uso es poco conocido en este país y en general en toda América se conocía poco; sin embargo, a causa de la última guerra y a la falta de bodegas para el transporte, se inició su preparación industrial, ya que tal proceder ahorra el 20 % del tonelaje y reduce grandemente la necesidad de refrigeración en el transporte y el almacenamiento.

Desde siglos ha sido preparado y usado en escala doméstica en Egipto, India, como también en Europa (Francia, Alemania y Balcanes). Era costumbre hervir la manteca, eliminando así todo el agua, siendo el aceite separado por decantación de los sólidos no grasos que precipitan.

Investigadores como El-Rafey, Richardson y Henderson (37), estudiaron el efecto del método de preparación del aceite de manteca con respecto a su tiempo de conservación. Para aumentar éste período en aceites de manteca filtradas, ensayaron mezclas de to-

coferoles con fracciones fosfolípidas.

El aceite era colocado en vasos abiertos y calentado en un termostato con baño de aceite mineral a 80°C., resguardando las muestras de la luz solar directa; usando para la estimación de peróxidos el método iodométrico de Wheeler modificado por Henderson y Young (38).

Se llegó a la conclusión, de que el aceite preparado por calentamiento de la manteca (método del hervido) a 110°C., y separación del residuo por centrifugación, es más resistente a la rancidez oxidativa que si menores temperaturas son utilizadas, ó el aceite es filtrado. Esto se debe como comprobaron, de la transferencia de fracciones fosfolípidas de la fase acuosa a la fase del aceite, y seguramente de la incorporación de productos derivados de la desnaturalización del sistema fosfolípido-protéico, ya que quedó establecido por numerosos autores la acción antioxidante de los emánocidos (1)(39)(40)(41) y compuestos afines (con grupos sulfhidrílicos)(42)(43)(44), que se separan de las proteínas por desnaturalización del calor.

B) Antioxidantes en polvo de leche y la estimación de peróxidos.

Las leches en polvo de reciente elaboración contienen pocas bacterias y muy poca humedad, a menos de un gran aumento del contenido en agua, los pocos microorganismos presentes disminuyen con el tiempo y la posible destrucción por esta causa es eliminado. No así la rancidez oxidativa (1).

Lea en un trabajo importante (29), notifica las condiciones ideales de concentración de oxígeno (0,01 ml por gramo de polvo) en que debe envasarse éste producto. Cita que concentraciones de 0,04 ml/gr. (que corresponde a 4% de oxígeno en el espacio hueco),

en polvo de leche enteras, obtenidas por el método de pulverización, desarrollan a una temperatura de 15°C. sobregustos en 7 meses y en 12 meses un gusto y olor rancio definitivo.

Desde un tiempo relativamente reciente éste problema atrajo el interés a ciertos investigadores que intentaron resolverlo por los siguientes medios: 1) el envasamiento adecuado en recipientes barnizados y no estañados (tipo fenol-formaldehído)(45); 2) el envasamiento en atmósferas de nitrógeno ó a presión reducida (1)(29) (46); 3) el uso de antioxidantes.

Peters y Kusher en 1937 se atribuyeron el privilegio de haber notificado, que el olor fresco de las leches en polvo era retenido si se mezclaba con flores de avena molidas ó se agregaba a la leche antes de ser secada por pulverización.(47).

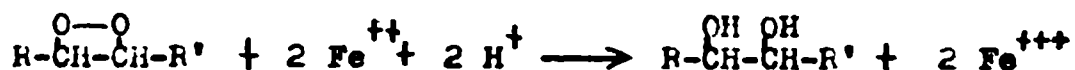
Wright usó flores de avena y hidroquinona con cierto éxito. Sin embargo la hidroquinona a una concentración de 0,5% en la grasa impartía un gusto metálico a los productos tratados (47).

Jack y Henderson utilizaron Avenex, Avenol y vitamina C. Avenex en una concentración de 2 a 3% del peso total ó 0,2% de Avenol, prevenían la aparición de gustos oxidados hasta 8 meses. Siendo para Hollender y Tracy los más efectivos la resina de guayaco y la hidroquinona. Hilditch ensayó el galato de etilo para aumentar el tiempo de conservación (47).

La vitamina C y el ácido d-glucó ascórbico fué utilizado también por otros investigadores (48) en manteca, leche condensada y polvos de leche.

Los trabajos más extensivos fueron hechos por Chapman y McFarlane (49), que ensayaron el aceite de germen de trigo (0,1% respecto a la materia grasa), adicionado a la leche antes del secado por pulverización.

métodos iodométricos (10)(50), en cuanto a reproducibilidad y sensibilidad, más aún para el estudio de material como es la leche en polvo, en que la grasa es íntimamente asociada a las proteínas, perfeccionaron el método colorimétrico de Yule y Wilson (1)(10)(49). Se basa en la oxidación del ión ferroso a férrico por los peróxidos presentes, y su estimación colorimétrica como tiocianato férrico. El equivalente en peróxido es calculado en base a la siguiente reacción:



Se extrajo la grasa con acetona anhidra, agregando a una parte alícuota del extracto una solución 0,1% de sal de Mohr y 0,4% de tiocianato de amonio en acetona, el color desarrollado fué medido por un espectrofotómetro Coleman previamente calibrado. Este método colorimétrico indica la presencia de peróxidos en un estado más prematuro que lo dan los métodos iodométricos, además de dar resultados más altos (10). El testigo (sin agregado de antioxidante), después de 9 semanas tenía gusto y olor netamente deficiente (correspondiente a 5 miliequiv. de agrup. peróxido por kg. de leche en polvo). La leche tratada con aceite de gérmen de trigo, presentaba estos caracteres recién a las 24 semanas (49).

II) PARTE EXPERIMENTAL.

1) Aislación del ácido nordihidroguayarático de Larreas argentinas por el método de Ole Gisvold. (20)

El material vegetal (Larrea Divaricata Cav.) usado para la extracción del NDGA, procedió de Anillaco Dep. Castro Barros, Provincia de la Rioja, habiendo sido recolectado en febrero del corriente año.

Se percolaron 800 gramos de hojas y tallos pequeños secos, con 3,5 litros de solución de NaOH al 5% adicionado de 2% de $S_2O_4Na_2$. (Debe tenerse la precaución de utilizar para estas extracciones un hidrosulfito de buena calidad, obteniéndose en caso contrario fracciones con precipitados amorfos, debido a la falta de un medio reductor conveniente, sin cristales de NDGA). El líquido percolado recibido en un frasco colector, se acidificó con ácido acético, dejándose en reposo durante 3 días.

El barro decantado se disolvió en 430 cc. de alcohol etílico de 96%, agregándose acto seguido 1150 cc. de éter sulfúrico. Las impurezas insolubles en alcohol-éter, son separadas por filtración, y el líquido límpido pasado a una ampolla de decantación es lavado tres veces con 550 cc. de agua destilada.

Se procedió luego a la extracción fraccionada, usando 15 ml de solución de NaOH al 5% y 2% de $S_2O_4Na_2$ cada vez, agitando uniformemente durante dos minutos y medio. El líquido decantado se aciduló con acético, colocándose en el baño maría unos minutos para evaporar el éter. Se separaron 16 fracciones. Después de 24 horas presentaron el aspecto siguiente:

- Fracción 1 : brea negra poco fluida, pegajosa.
- " 2 : " " " " " "
- " 3 : " de color pardo, más consistente.
- " 4 : sólido amorfo de color pardo rojizo.
- " 5 : " " " " anaranjado.
- " 6 a 13 : sólidos amorfos y cristalinos de color amarillento-anaranjado que contienen el NDGA.
- " 14: sólido anaranjado-rojizo con pocos cristales.
- " 15: sólido anaranjado-rojizo sin cristales.
- " 16: líquido oleoso, color pardo rojizo sin cristales.-

Se obtuvo 31 gramos de NDGA impuro, correspondiente a las fracciones 6-13, o sea un rendimiento de 3,9 % respecto al vegetal seco.

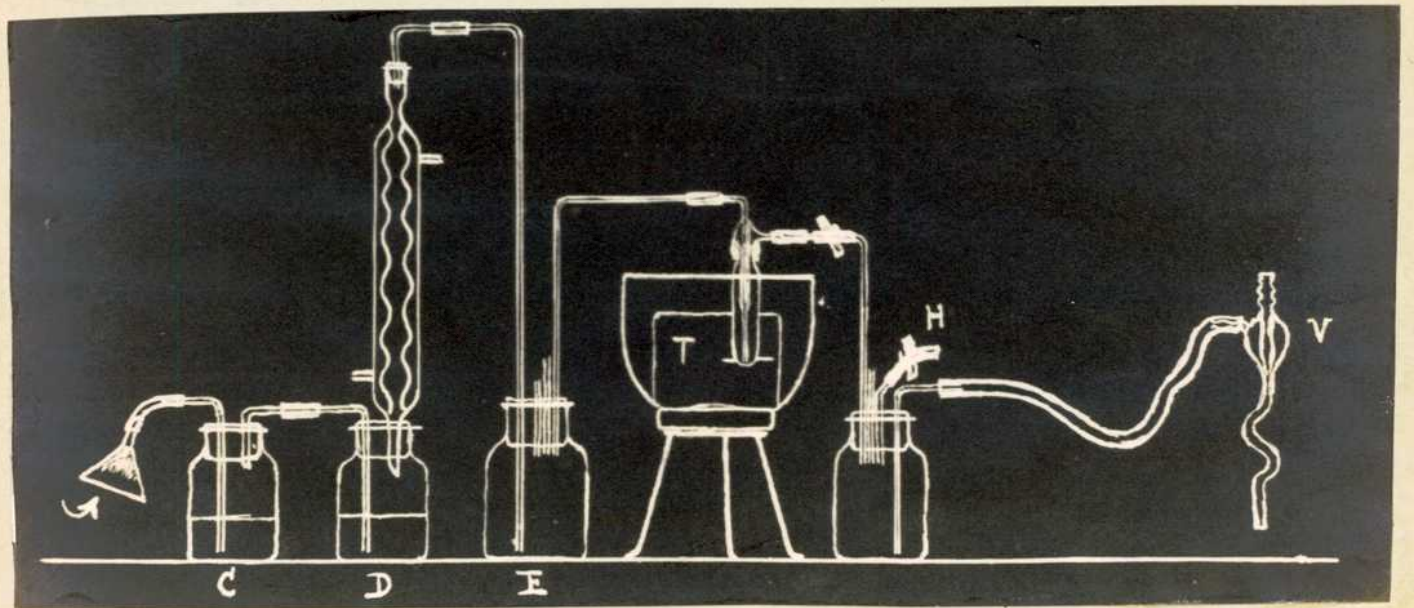
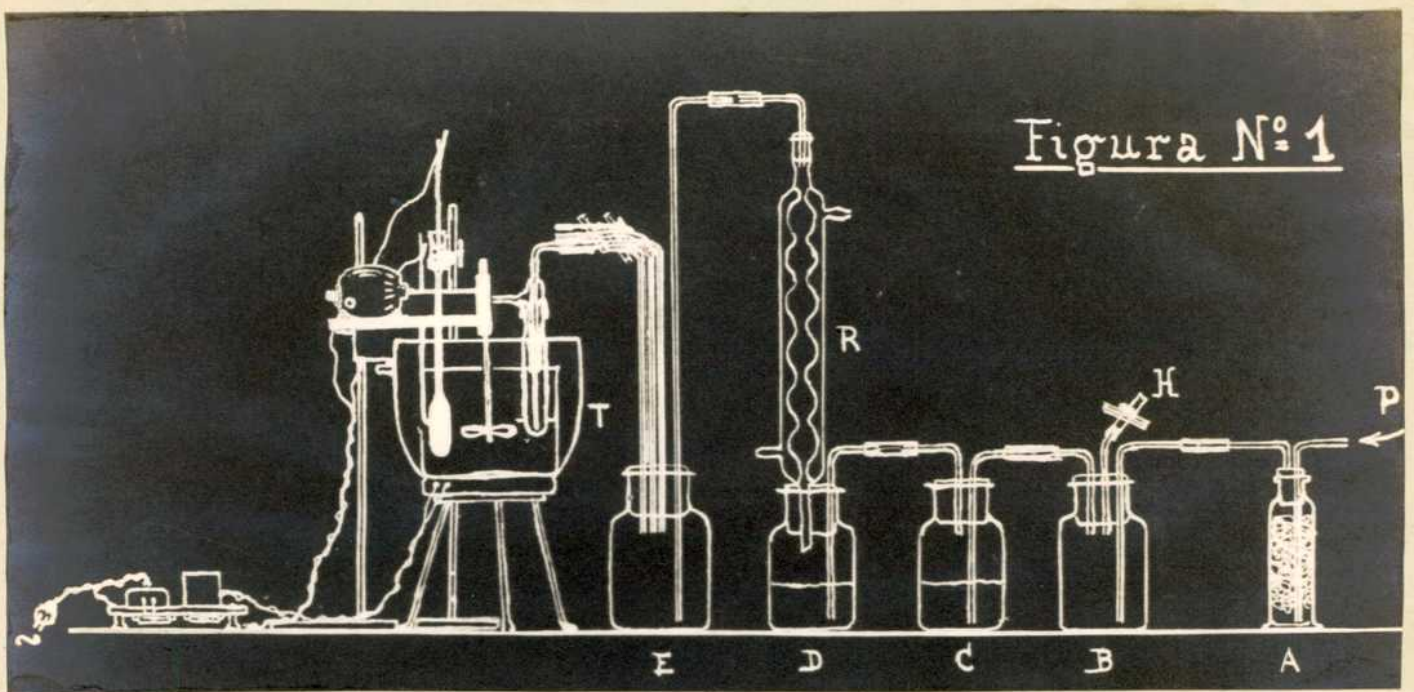
Se purificó el NDGA por cristalizaciones sucesivas (tres) en ácido acético glacial caliente, obteniéndose finalmente 6 gramos de este compuesto, con un punto de fusión: 184°C.

2) Ensayo acelerado por el método de aeración de Swift, de la acción antioxidante del ácido nordihidroguayarático en aceite de manteca.-

De los diversos métodos que se conocen (1), para comparar la estabilidad de las materias grasas en el estudio de inhibidores de oxidación, el ensayo de estabilidad de Swift, descripto por King, Roschen e Irwin, ha sido adoptado en la mayoría de los laboratorios americanos por su sencillez y reproducibilidad de datos (50).

Ha sido éste el utilizado para ensayar la acción inhibidora del NDGA en aceite de manteca.

Figura N° 1



Varias modificaciones propuestas por Riemenschneider, Turer y Speck (50) y el "Committee on Analysis of Commercial Fats and Oils" (51) han sido adoptadas, además de otras condiciones como ser la de trabajar a 80°C.

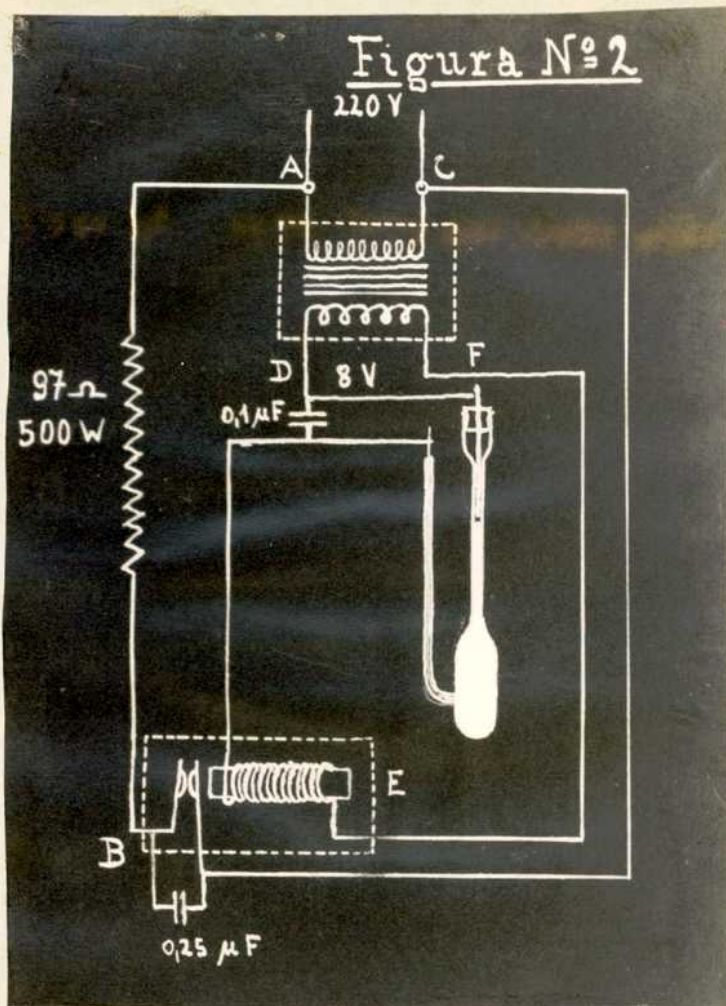
El método original consiste en hacer burbujear aire lavado a una velocidad más o menos constante, a través del aceite calentado a 100°C, determinando los valores del índice de peróxido a intervalos, hasta que un ascenso brusco nos indique el final del período de inducción.

Se entiende por período de inducción de una grasa o aceite, el intervalo de tiempo más o menos definido, en que existe una cierta refractariedad a la oxidación (la absorción de oxígeno es lenta), y en que las variaciones de los caracteres organolépticos no se perciben, o bien son relativamente pequeñas. Le sigue una fase en que la velocidad de reacción referente a la oxidación crece logarítmicamente, apareciendo el olor y sabor rancio.

A) Descripción del termóstato y del tren de aereación.

El aparato usado (fig. 1) consta de dos partes: un sistema distribuidor de aire (tren de aereación), con la fuente de presión P (bomba de Pfeiffer) o de vacío V (trompa de agua), conectado a los tubos de burbujeo, y un baño termóstato T.-

El termóstato, que difiere del usado comunmente, está constituido por una olla esmaltada de 23,5 cm de diámetro por 16,5 cm de fondo, con una capacidad hasta de diez tubos de aereación. Estos tubos están sostenidos por un soporte de hojalata, sumergido en aceite mineral de alto punto de inflamación. La olla va asentada sobre un plato refractario con resistencia eléctrica de 500 vatios, suficien-



te para calentar el baño a la temperatura deseada, manteniéndose ésta por medio de un termoregulador eléctrico y una agitación conveniente. Puede verse por la fig.2 la construcción de los circuitos correspondientes y su funcionamiento, cuyo principio es ya conocido. (ABC circuito de calefacción, DEF circuito de termoregulación).

Las oscilaciones de la temperatur. eran de más o menos 0,5°C. La construcción de este sistema resultó su-

mamente práctica, ya que permitió seguir la aereación ininterrumpidamente.

La corriente de aire originada por una bomba Pfeiffer, pasa primero por un frasco con algodón A, para retener gotitas de aceite que podrían ser arrastradas, de ahí a un frasco B con llave de escape H para regular la presión. Sigue por un frasco lavador C, con agua y otro D que contiene solución ácida de bicromato de potasio (2% de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ y 1% de SO_4H_2). Un refrigerante a bolas R, evita el arrastre mecánico del agua y regula la humedad del aire, que después de pasar por E llega a los tubos de aereación.

El otro esquema (fig. 1) muestra la aplicación de una trompa

COPIA

de agua para originar la corriente de aire. Fué utilizada en ensayos previos, por la falta de la bomba de Pfeiffer. Tiene el inconveniente de no poder percibirse por el olfato el estado de las muestras.

Como tubos de aereación se adoptaron los propuestos por Riemenschneider, Turer y Speck (fig. 3). Son enteramente de vidrio y sus ventajas sobre los tubos con tapón de goma son las siguientes:

- 1) facilidad para realizar su completa limpieza (primero con solución de HONa y luego con mezcla sulfocrómica);
- 2) es eliminada la posible contaminación con partículas de caucho que por su naturaleza pueden variar el proceso de oxidación;
- 3) un detalle de su construcción A, previene la formación de espuma y el arrastre de la muestra de aceite, y
- 4) de poder alcanzar mayor reproducibilidad en el caudal.-

B) Standardización del aparato. Curvas representativas. Técnica y métodos.-

Método de preparación del aceite de manteca.

En un embudo de filtración en caliente perfectamente limpio, en cuyo extremo se adicionó un tubo de vidrio afinado por medio de un trozo de tubo de goma y su respectiva pieza de Hoffmann, se colocaron 200 gr de manteca fresca. Un cartón recortado, con un agujero para colo-

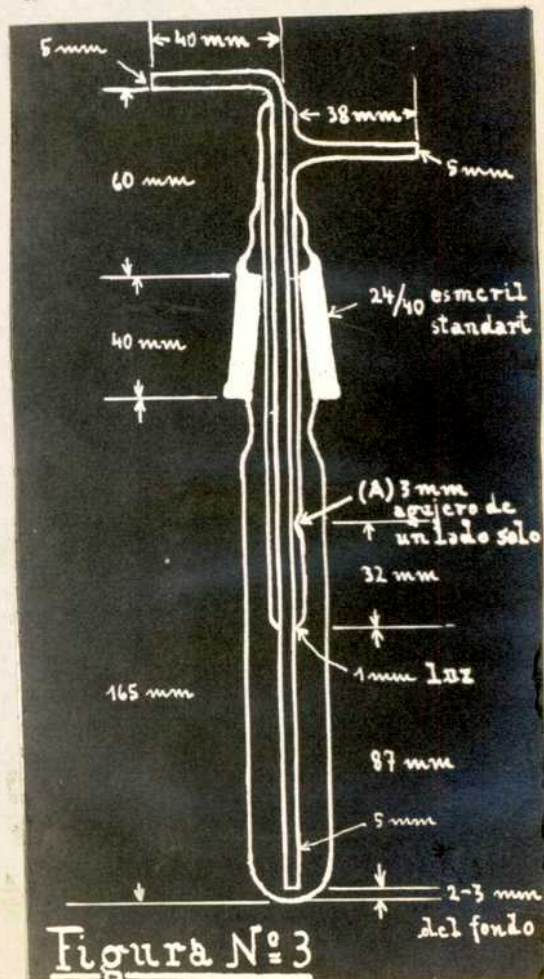


Figura N° 3

car un termómetro, servía de tapa para evitar la caída de sustancias extrañas.

Se hizo fundir la manteca, tratando de no elevar la temperatura arriba de 75°C. Dejando en reposo, se decantó la fase acuosa. El aceite se pasó a un erlenmeyer con tapa esmerilada, cuidadosamente limpiado y seco, agregándose unos 15 gramos de sulfato de sodio anhidro. Se dejó en contacto una hora al lado del baño maría, a unos 30°C., para mantener la fusión, agitando de vez en cuando. Se filtró por papel de filtro común, usando de nuevo el embudo de filtración en caliente. El aceite de manteca así obtenido se usó en los diferentes ensayos.

Standardización y método iodométrico para la determinación de peróxidos.

Para standardizar el aparato, se colocaron 20 ml de aceite de manteca respectivamente en dos tubos de aereación. Estando el baño a la temperatura deseada y las conexiones en orden, se puso la bomba en marcha anotando la hora. Los tubos estaban sumergidos hasta 3 cm arriba del nivel de las muestras, y por consiguiente al abrigo completo de la luz.

A falta de un sistema adecuado, para ajustar el caudal de aire a 2,33 ml por segundo, según describe el método, y teniendo en cuenta que variaciones entre límites bastante amplios (2,5 a 10 litros por hora) no influyen en la exactitud de las determinaciones, se trató de igualar en lo posible el paso de aire en cada tubo, por medio de pinzas de Hoffmann, contando las burbujas por minuto.

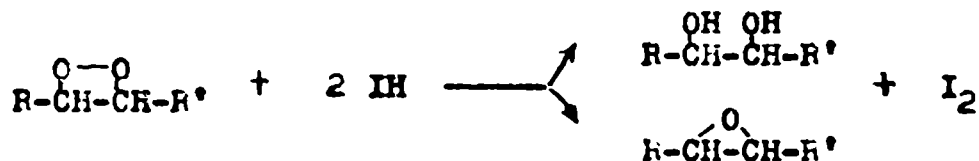
Se determinó el índice de peróxido por el método iodométrico de Wheeler, modificado por Henderson y Young (38).

Fué elegido éste método tomando como base los trabajos de El-Hafey, Henderson y Richardson (ver introducción), que aunque criticado anteriormente, nos pareció suficientemente exacto para hacer un estudio comparativo del uso del NDGA en mantecas.

De todos los métodos iodométricos conocidos es a juicio de los autores, el que dió valores más altos y virajes más netos.

Es como sigue: se pesa en un dedal de vidrio 0,3 a 0,5 gramos de la muestra y se coloca en un frasco con tapa esmerilada de 150 ml de capacidad, más 15 ml de una mezcla 2:1 acético glacial (para Wijs no debe dar reacción positiva de Schiff) y tetracloruro de carbono, se agrega 1 ml de solución saturada de IK, agitándose con movimiento rotatorio en la oscuridad. Después de agregar 50 ml agua destilada y 2 ml de solución de almidón al 1%, se titula con una solución de tiosulfato 0,002 N con bureta de 25 cc. La solución de tiosulfato fué preparada por dilución a partir de una solución 0,1 N exactamente titulada según el método descrito en Treadwell-Hall "Analytical Chemistry Quantitative" ed.9a.,pág. 611.-

La adición del ácido acético facilita la descomposición cuantitativa de los peróxidos en base a la siguiente reacción:



El número de miliequivalentes de agrupación peróxido -O-O- presente por 1000 gramos de grasa es calculado de los mililitros de solución de tiosulfato 0,002 N gastados y del peso de la muestra por la siguiente fórmula:

$ \frac{\text{ml. sol. tiosulfato N } 1000}{\text{peso de la muestra}} = \frac{\text{miliequiv. de agrupación peróxido}}{1000 \text{ gr de grasa}} $
--

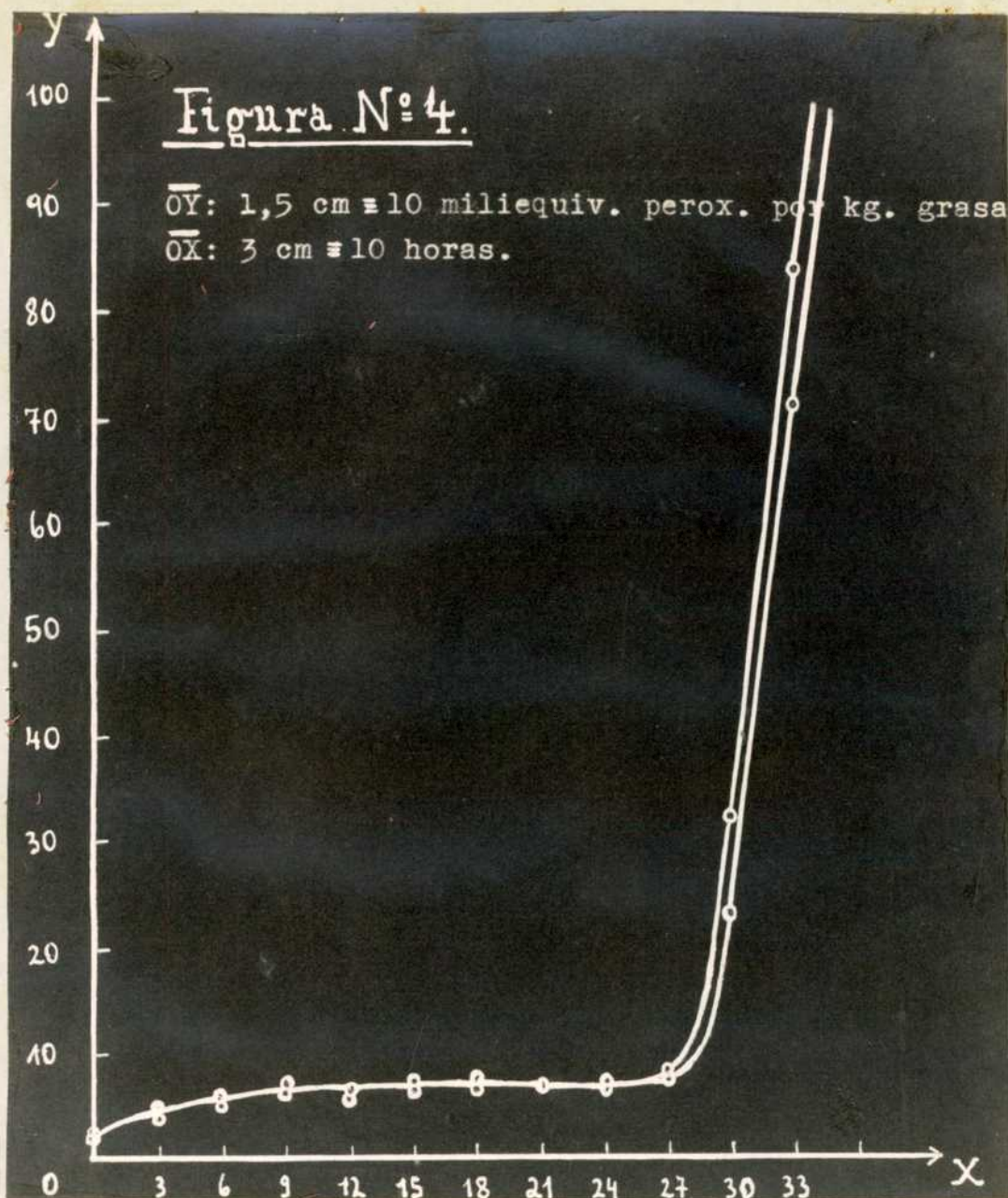
Variaciones en el peso de la muestra y volumen de los reactivos como del tiempo de reacción producen diferencias apreciables en el valor del índice de peróxido, siendo de menor importancia cuando la estimación se hace a altas temperaturas y con el método de aereación (50).

Además quiero hacer notar, que para la completa disolución de la muestra de grasa en el disolvente ácido acético-tetracloruro de carbono, ésta debe estar en estado líquido, para lo cual puede ponerse unos minutos cerca de una ^{fuerza} de calor. Se había observado que agregando la muestra en estado semisólido, una vez agitado, la disolución no era completa.

Los datos y las curvas pueden verse en el cuadro N°1 y en la figura N°4 respectivamente.-

Cuadro N° 1.

Muestra N°	1			2		
	p.m.	ml. gast.	I.P.	p.m.	ml. gast.	I.P.
0	0,3773	0,40	2,1	0,3551	0,45	2,5
3	0,3429	0,65	3,8	0,3742	0,88	4,7
6	0,4008	1,0	5,0	0,3927	0,95	4,8
9	0,3594	1,3	7,2	0,3543	1,15	6,5
12	0,3833	1,2	6,3	0,3933	1,12	5,7
15	0,3416	1,15	6,7	0,3559	1,25	7,0
18	0,3798	1,35	7,1	0,3715	1,25	6,7
21	0,3311	1,15	6,9	0,3172	1,1	6,9
24	0,3642	1,25	6,9	0,3185	1,13	7,1
27	0,3857	1,52	7,9	0,4005	1,5	7,5
30	0,3022	3,5	23,2	0,3858	6,2	32,1
33	0,3988	14,25	71,3	0,3777	15,87	84,0



C) Curvas representativas del proceso oxidativo con diferentes concentraciones de ácido nordihidroguayarático.

Standardizado el aparato de aereación se procedió de la siguiente manera: En cuatro tubos marcados, se colocaron 20 ml de aceite de manteca resp. A los número 2, 3 y 4 se adicionó 1, 0,4 y 0,2 ml de una solución alcohólica de NDGA (50 mg disueltos en 5 ml) que corresponden concentraciones de 0,05%, 0,02% y 0,01%. Puesto el aparato en marcha, se determinó, hasta la rancidez del testigo, 2 veces por día, el valor del índice de peróxido, y luego cada 24

horas, tomando datos del olor y del color de las muestras.

Hasta alrededor de las 100 horas no había diferencia en el olor de los tres tubos con inhibidor, no era el del aceite fresco pero no tenían olor sebáceo. A las 200 horas de iniciado el ensayo, el olor de las muestras 1 y 2 era sebáceo y el del 3 era más marcado recordando al aceite de pescado. El color del 3 era más blanquecino. Llegado a las 300 horas el 3 estaba rancio, habiéndose decolorado por completo. La muestra del tubo 2 tenía olor deficiente y un color más pálido con respecto al número 1. La decoloración de este último se hizo paulatinamente hasta llegar a las 700, teniendo ya a las 350 horas un olor netamente rancio.

Lundberg, Dockstæder y Halvorson (52) estudiaron la destrucción oxidativa de varios antioxidantes, entre ellos el NDGA en función del tiempo, paralelo a la concentración de peróxidos. Utilizaron el método de Swift a 100°C con muestras de lardo adicionadas de 0,02 %, 0,1 % y 0,5 % de NDGA.

Las conclusiones son por cierto interesantes, la destrucción de antioxidantes fenólicos en grasas no es una reacción de orden cero (que a mayor conc. de antioxidante, proporcionalmente mayor destrucción del inhibidor), sino complicada por productos de oxidación de las grasas y posiblemente del mismo inhibidor. Observaron que a mayores concentraciones de antioxidante, tienen un efecto catalítico en la formación de peróxidos, en la etapa inicial (cuadro 2). A causa de este fenómeno se dedujo que cada antioxidante del tipo fenólico posee una concentración óptima con lo que respecta a la prevención de rancidez detectable organolépticamente.

Se comprobó que al tiempo de inflexión de las curvas, o sea la terminación del período de inducción, el antioxidante no ha sido destruido completamente.

ENSAYO ACELERADO POR EL METODO DE AERACION DE SWIFT, DE LA
ACCION ANTIOXIDANTE DEL NDGA EN ACEITE DE MANTECA A 80°C.

\overline{OY} : 2 cm 10 miliequiv. de agrupacion peróxido
por kg. de aceite de manteca.

\overline{OX} : 3,75 cm 100 horas.

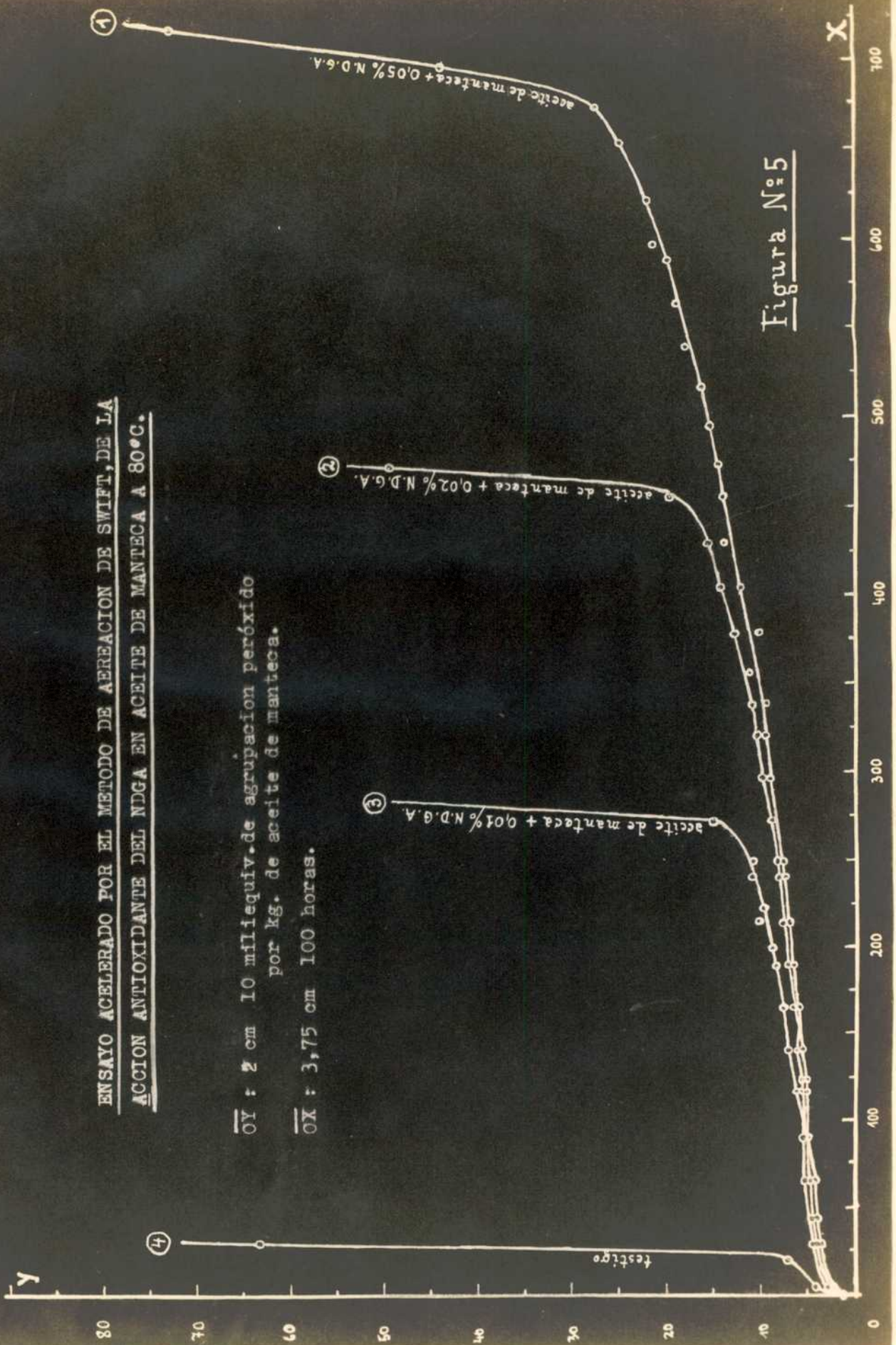


Figura N°5

Prácticamente es más importante que un antioxidante no produzca en la etapa inicial de oxidación una elevada concentración de peróxidos y compuestos rancios, a que posea una duración prolongada o imparta a la grasa a la cual se agrega, un índice de estabilidad muy elevado.

Indice protector	=	$\frac{\text{tiempo de estabilidad de grasa + inhibidor}}{\text{Tiempo de estabilidad del testigo}}$
------------------	---	--

El índice protector o de estabilidad de las 3 muestras, considerando como final del período de inducción el momento en que el aire que sale del tubo de desprendimiento tenga olor rancio, es:

Indice protector muestra N° 1:	ac. manteca	0,05%NDGA	=	$\frac{350}{25}$	=	14
"	"	"	N° 2:	"	0,02%	" = $\frac{300}{25}$ = 12
"	"	"	N° 3:	"	0,01%	" = $\frac{200}{25}$ = 8

El índice protector, teniendo en cuenta las inflecciones de las curvas, nos da:

muestra N°1 = $\frac{699}{29} \approx 24$; muestra N° 2 = $\frac{473}{29} \approx 16$; muestra N°3 = $\frac{296}{29} \approx 10$.-

Aceptándose para grasa de leche como rancidez incipiente el valor de 5 mequiv. de agrupación de peróxido por kg., tendríamos:

muestra N°1 = $\frac{91}{8} \approx 11$; muestra N°2 = $\frac{91}{8} \approx 11$; muestra N°3 = $\frac{91}{8} \approx 11$.-

El-Rafey, Richardson y Henderson (37), obtuvieron índices protectores mucho más bajos, oscilando entre 1,5 a 3. (usando tocoferoles más fracciones fosfolípidas como antioxidante).-

Relación entre la reacción de Kreiss y el índice de peróxidos en grasa de leche.

Con el fin de establecer una relación entre la reacción de

Kreiss y el índice de peróxido, se procedió como sigue.

En cuatro tubos de aereación se agregaron 20 ml de aceite de manteca y solución alcohólica de NDGA, correspondiente a: Muestra N°1; 0,1%; N°2: 0,05%; N°3: 0,01% y N°4: 0,005% de NDGA; determinándose paralelamente al índice de peróxido la reacción de Kreiss.

La reacción de Kreiss. Técnica.

El uso cuantitativo de la reacción de Kreiss respecto al grado de rancidez de una grasa ó aceite ha sido muy discutido.

Holm y Greenbank notificaron que la intensidad del color desarrollado, no está en relación al grado de rancidez detectado por el olor y el gusto (1). Otros autores apoyaron la opinión de que la reacción de Kreiss no puede ser usada como verdadera medida de rancidez, pero que grasas que dan color en una dilución de 1 en 20 son definitivamente rancias.

Tal es que ésta reacción no está incluida entre los métodos oficiales de la American Oil Chemists Society. En Alemania no se consideraba suficientemente segura como adaptable para métodos standart, siendo el gusto y olor los únicos medios suficientemente seguros (1).

Cuatro tubitos de ensayé (como los utilizados para la reacción de Wassermann-Kahn), de espesor y tamaño uniforme, de 3,5 ml de capacidad, se marcó el nivel correspondiente a 0,2 ml. Se comprobó que 6 gotas de aceite de manteca, usando los tubos de burbujeo como pipeta, ocupaban el volumen correspondiente.

A 0,2 ml de aceite de manteca se agregaron 0,5 ml de aceite de vaselina (1 en 3,5) y 0,7 ml de ácido clorhídrico conc. Previa agitación (un minuto), se adicionaba 0,7 ml de solución 0,1% de floro-

glucina en éter fresco, preparada en el momento de uso. Después de un minuto de agitación y separación de las capas se observaba el color.

Los resultados pueden verse en el cuadro 3. A las 109 horas de iniciado el ensayo, se observó reacción positiva de Kreiss para las cuatro muestras, correspondiendo a un índice de peróxido 5,0 para el N°1; 3,9 para el N°2; 3,7 para el N°3; y 6,7 para el N°4.

Por causas no conocidas, posiblemente errores experimentales, no ha vuelto a observarse el efecto catalítico del NDGA en la formación de peróxidos durante la etapa inicial. También los índices de peróxido de la muestra N°1 no están en correlación con la cantidad de antioxidante agregado con respecto a las muestras 2; 3 y 4.-

3) Ensayo de la acción inhibidora de oxidación del ácido nordihidroguayarático en mantecas bajo condiciones ambientales.

Se realizaron dos ensayos paralelos con diferentes muestras de manteca.

Para el primero se pesaron en 4 vasitos de pptación. con sus respectivas varillas 20 gr. de manteca, agregando con pipeta solución alcohólica de NDGA correspondiente a 0,2%; 0,1% y 0,05 % de antioxidante (ver cuadro 4), determinando el índice de peróxido y la reacción de Kreiss periódicamente. El cuarto vasito sin NDGA, como testigo.

En el segundo ensayo se determinó conjuntamente con el valor de peróxido el gusto y el olor (cuadro N° 5).

Una vez agregado el antioxidante, previa agitación, se colocaron los vasitos sobre el baño maría hasta fusión incipiente,

CUADRO N.º 3.

uestra N.º	① 0,15 VARA				② 0,051 VARA				③ 0,01 VARA				④ 0,005 VARA						
	erro- res- % —	1.º —	2.º —	3.º —	erro- res- % —	1.º —	2.º —	3.º —	4.º —	erro- res- % —	1.º —	2.º —	3.º —	4.º —	erro- res- % —	1.º —	2.º —	3.º —	4.º —
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,453	0,7	3,0	neg	neg
13	0,360	0,5	2,7	neg	0,413	0,35	1,7	neg	0,423	0,5	2,4	neg	0,433	0,45	1,330	0,45	2,7	neg	neg
23	0,356	0,3	1,6	—	0,378	0,3	1,6	—	0,366	0,35	1,0	—	0,402	0,4	0,402	0,4	2,0	—	—
36	0,449	0,55	2,9	neg	0,360	0,53	2,9	neg	0,401	0,6	3,0	neg	0,372	0,55	0,372	0,55	3,5	neg	neg
56	0,353	0,5	2,6	neg	0,477	0,4	1,7	neg	0,393	0,5	2,5	neg	0,459	0,55	0,459	0,55	3,0	neg	neg
70	0,355	0,6	3,3	—	0,409	0,55	2,7	—	0,363	0,5	2,7	—	0,356	0,55	0,356	0,55	3,1	—	—
86	0,343	0,7	4,1	neg	0,365	0,65	3,6	neg	0,459	0,8	3,5	neg	0,334	0,6	0,334	0,6	3,6	neg	neg
93	0,353	0,74	4,2	—	0,364	0,65	3,6	—	0,359	0,7	3,9	—	0,325	0,55	0,325	0,55	3,4	—	—
109	0,379	0,95	5,0	pos	0,400	0,7	3,9	pos	0,403	0,75	3,7	pos	0,419	1,1	0,419	1,1	4,5	pos	pos
123	0,379	1,4	7,4	pos	0,370	1,0	5,3	pos	0,390	1,15	5,9	pos	0,344	1,15	0,344	1,15	6,7	pos	pos
134	0,426	1,12	5,5	—	0,391	0,95	4,3	—	0,536	1,3	4,0	—	0,373	1,0	0,373	1,0	5,2	—	—
149	0,376	1,3	6,3	pos	0,414	1,12	5,4	pos	0,392	1,2	6,1	pos	0,377	1,3	0,377	1,3	6,9	pos	pos
159	0,379	1,45	7,8	—	0,369	1,0	5,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
172	0,343	1,65	9,4	pos	0,360	1,25	6,8	pos	0,516	2,1	9,1	pos	0,391	1,5	0,391	1,5	9,5	pos	pos
206	0,379	2,0	10,6	pos	0,375	1,4	7,5	pos	0,314	1,35	9,6	pos	0,377	1,4	0,377	1,4	10,7	pos	pos

Cuadro N.º 4.

Muestra N.º	1 0,2% NDGA	2 0,1% NDGA	3 0,05% NDGA	4 TESTIGO
Manteca	15 gr	15 gr	15 gr	15 gr
Sol. alcohólicas de NDGA. (2 ml contienen 15 mg de NDGA)	2 ml	1 ml	0,5 ml	—
Alcohol	—	1 ml	1,5 ml	2 ml

Tiempo en días				
0	I.P. R.K.	0 neg.	0 neg.	0 neg.
7	I.P. R.K.	3,9 neg.	4,7 neg.	5,1 neg.
14	I.P. R.K.	6,1 neg.	7,7 neg.	8,4 neg.
21	I.P. R.K.	8,2 neg.	9,7 neg.	11,6 neg.
28	I.P. R.K.	10,6 neg.	13,2 neg.	16,0 neg.
35	I.P. R.K.	10,5 neg.	15,0 neg.	16,4 neg.
				completamente rancio

Cuadro N.º 5.

Muestra N.º		1 0,2% NDGA	2 0,05% NDGA	3 TESTIGO
Tiempo en días:				
10	I.P. gusto olor	6,5 aceboso, sobregusto normal. (tácico)	7,4 idem idem	9,9 rancio, poco neto idem
20	I.P. gusto olor	8,1 aceboso, sobregusto normal (tácico)	10,1 idem idem	14,6 rancio neto rancio suave
30	I.P. gusto olor	12,9 metácico más marcado rancio	15,2 idem idem	35,2 rancio neto rancio neto

volviéndose a mezclar bien el contenido. Los vasitos en todos los ensayos se taparon con papel y se colocaron en un cuarto con luz difusa, fuera de la acción de los gases y vapores de laboratorio.

A causa del resultado obtenido con lo que respecta a la percepción de un sobregusto metálico (nótase en el paladar con bastante persistencia), ya que el alcohol dificulta la percepción del gusto una vez preparadas las muestras, se disolvieron 80 mg de NDGA en 8 gr de aceite de manteca colocando en cuatro vasitos las siguientes cantidades:

Cuadro N° 6.

Muestra N°	1 0,2% NDGA	2 0,1% NDGA	3 0,05% NDGA	4 TESTIGO
Manteca	12 gr	12 gr	12 gr	12 gr
Aceite de manteca con 1% de NDGA	3 gr	1,5 gr	0,75 gr	—
Aceite de manteca	—	1,5 gr	2,25 gr	3 gr
Gusto	sobregusto metálico, bastante astringente	menos acentuado	menos acentuado	normal

El resultado es concluyente. Otras personas que probaron las muestras confirmaron mis resultados.

Con respecto al gusto del NDGA, tal cual obtenido, se percibe también un gusto algo astringente en el paladar. Lo mismo el de procedencia norteamericana.

4) Ensayo de la acción antioxidante del NDGA a diferentes concentraciones con la variación de la conc. de diacetilo en manteas artificiales.

Se trató de estudiar esta cuestión en base a las propiedades

antagónicas de estos dos compuestos.

En 5 vasitos de pptación., se colocaron respectivamente:

Cuadro N° 7.

Muestra N°	① 0,05%NDGA 20 ppm dia cetilo	② 0,02 % 20 ppm	③ 0,02 % 20 ppm	④ TESTIGOS 20 ppm	⑤ —————
Aceite de man- teca	16,5 gr	16,5 gr	16,5 gr	16,5 gr	16,5 gr
Sol.acuosa de diacetilo (0)	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml	—————
Solución alco- hólica de NDGA (al 0,05 %)	1,0 ml	0,4 ml	0,4 ml	—————	—————
Agua destilada	—————	—————	1,75ml	—————	3,0 ml
Alcohol	—————	0,6 ml	0,6 ml	1,0 ml	1,0 ml

Los índices de peróxido determinados en intervalos de 10 días son respectivamente:

0 días	1,9	1,9	2,1	1,9	2,0
10 días	5,4	5,7	5,7	7,7	6,4
20 días	6,3	7,1	8,1	18,4	15,1

(0) 3,5 ml de sol. de diacetilo contienen 0,004 gr de dicho compuesto.-Equivale a 20 partes por millón.-

Los cálculos de las concentraciones consignadas en el cuadro N° 7 se hicieron en base a los datos mencionados en la introducción bibliográfica.-

Un ensayo semejante con aceite de manteca, hecho simultaneamente en estufa de incubación a 37°C. (se agregó el diacetilo en solución eterea), dió el siguiente resultado:

Cuadro N° 8.

Muestra N°	① 0,05% NDEA 20ppm diac	② 0,02 % 20 ppm	③ 0,02 % 10 ppm	④ TESTIGOS 20 ppm	⑤ —
Mequiv. de agrup. per- óxido por Kg de grasa a los:					
0 días	1,9	1,7	1,8	1,9	1,8
7 días	2,1	1,9	2,2	2,6	2,7
14 días	1,7	2,3	1,8	2,2	2,7

Al día siguiente de iniciado este ensayo se pudo comprobar en el ambiente el aroma de diacetilo debido a su volatilización.

Con los resultados de las experiencias llevadas a cabo, no se ha podido verificar la variación de la acción antioxidante del NDEA a diferentes concentraciones con la variación de la conc. de diacetilo. Puede observarse por los datos del primer ensayo, un aumento del índice de peróxido del testigo con diacetilo, respecto a la muestra sin dicho compuesto.-

III) CONCLUSIONES.

1) Con el fin de estudiar la acción antioxidante del ácido nordihidroguayarático en aceite de grasa de leche y en mantecas, se ha aislado dicho compuesto de Larreas argentinas (Larrea Divaricata Cav.), con un rendimiento de 3,9% respecto al material vegetal seco.-

2) Como método de estudio del efecto inhibidor de oxidación del NDGA en aceite de manteca, se ha elegido el ensayo de estabilidad de Swift modificado por Riemenschneider, Turer y Speck, trabajando a una temperatura de 80°C.-

Se ha ensayado la reproductibilidad de éste método con resultados satisfactorios.-

3) Fué estudiada la acción antioxidante del NDGA a diferentes concentraciones (0,05%; 0,02% y 0,01%) en aceite de manteca pudiéndose establecer las siguientes conclusiones:

- a) que la percepción de la rancidez organoléptica (olor), fué constatado en todos los casos antes del ascenso brusco de la concentración de peróxidos;
- b) una concentración de 0,02% de NDGA en aceite de manteca ha resultado más efectivo en inhibir la rancidez perceptible organolépticamente (olor) con respecto a muestras adicionadas de 0,01% y 0,05%;
- c) considerando como rancidez el valor de concentración de peróxidos 5, el índice protector es más ó menos igual en las tres muestras (-11), de ahí y por lo expuesto anteriormente vemos es innecesario el agregado excesivo de NDGA. Esto lo confirma el ensayo con la reacción de Kreiss que da positivo con la mis-

FOFNA

ma intensidad y al mismo tiempo, independientemente de la concentración de antioxidante agregado.-

- 4) En ensayos hechos en mantecas bajo condiciones ambientales, hemos comprobado:
- a) que la adición de NDOA imparte un sobregusto, perceptible todavía en concentraciones 0,05%. Esto no excluye la posibilidad de su uso en grasa de leche de vaca, agregándolo en concentraciones menores (0,002 a 0,005%) (53) con algún sinérgico.
 - b) que se puede aceptar como rancia una manteca que tenga un índice de peróxido entre 10 y 15 miliequivalentes en las condiciones y técnicas usadas.-
- 5) Se ha ensayado la acción antioxidante del NDOA a diferentes concentraciones con la variación de la concentración de diacetilo, habiéndose observado solamente un aumento del índice de peróxido del testigo adicionado con diacetilo, respecto a la muestra sin dicho compuesto.-

F. Oestreich

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Lea C.H. "Rancidity in Edible Fats" (1939).
- (2) Greenbank G.R., Holm G.E., Ind. Engng. Chem. 33:1058; (1941).
- (3) Blut E.G., J. Council Sci. Ind. Research. 18:53; (1945).
- (4) Ziels K.W., Schmidt W.H., Oil & Soap. 22:327; (1945).
- (5) Moureau C., Dufraisse C., Chem. Ind. Rev. 47:619; (1928).
- (6) Clecott H.S., Emerson O.H., J. Am. Chem. Soc. 59:1008; (1937) y
63:1142; (1941).
- (7) Mattil H.A. Oil & Soap. 22:1; (1945).
- (8) Columbie C. Oil & Soap. 23:184; (1945).
- (9) Clecovitch H.S., Mattil H.A., J. Biol. Chem. 91:65; (1931).
- (10) Lips A., McFarlane V.D., Oil & Soap. 20:193; (1943).
- (11) Columbie C., Mattil H.A., J. Am. Chem. Soc. 63:1279; (1941).
- (12) Stirton A.V., Turer J., Riemschneider R.W., Oil & Soap. 22;
81; (1945).
- (13) Clecott H.S., Mattil H.A., J. Am. Chem. Soc. 58:2204; (1936).
- (14) Mitchell H.S., Black H.C., Ind. Engng. Chem. Ind. Sect. 35:50; (1943)
- (15) Bickoff E., Williams K.T., Sparks M., Oil & Soap. 22:128; (1945).
- (16) Green T.J., Hilditch T.P., J. Soc. Chem. Ind. London. 23T:56; (1937).
- (17) Dahle C.D., Nelson D.H., J. Dairy Sci. 24:29; (1941).
- (18) Musher S., C.A. 3816^{3;4;5}. (1941).
- (19) Columbie C., Mattil H.A., J. Am. Chem. Soc. 63:11142; 1279; (1941).
- (20) Ruth E. "Acido nordihidroguayarático en Larreas argentinas:
Larrea Divaricata y Cuneifolia" Tesis F.C.E.F. y N. Univ. Bs/As.
- (21) Crampton E.W., Mills N.F., C.A. 2200⁸ (1946).
- (22) Jour. of the Am. Oil Chemist's Soc. 24:1; (1947).
- (23) Smith F.H., Brady D.F., Comstock R.E., Ind. Engng. Chem. Ind. Sect.
37:1206; (1945).

FOFNA

- (24) Silver F.H., Food Industries 17;1454;(1945).
- (25) Mc.Connell J.E.,Esselen W.B., Jour. of the Am. Oil Chemist's Soc. 24;6;(1947).
- (26) Higgens J.W.,Black H.C., Oil & Soap. 21;279;(1944).
- (27) Girsold O., C.A. 1394⁰(1947); pat. USA N^o 2.408.924/1946.
- (28) Liebermann S.V.,Mueller G.P.,Stiller F.T., J.Am.Chem.Soc. 69;1540;(1947).
- (29) Lea C.,Moran T.,Smith J.A., J.Dairy Research. 13;162;(1943).
- (30) Hunziker O.F. "The Butter Industry"
- (31) Bendixen H.A., C.A. 7411²(1939).
- (32) Mendez Bar A.E. de "Contenido de diacotilo en mantecas de la ciudad de Bs. Aires" Tesis F.C.E.F.y N. Univ. Bs.As.
- (33) Mohr W.,Schrimpl E.,Arbes A., C.A. 535²(1940).
- (34) Prill A.,Hamner B.W., J.Dairy Sci. 23;159;(1940).
- (35) T6th E., C.A. 4862²(1941).
- (36) Richardson G.A.,El-Rafey M.S.,Long M.L., J.Dairy Sci. 30;397;(1947).
- (37) El-Rafey M.S.,Richardson G.A.,Henderson J.L., J.Dairy Sci. 27;807;(1944).
- (38) Henderson J.L.,Young H.A. Jour.Phys.Chem. 46;670;(1942).
- (39) Taufel K.,K6ohling J., C.A. 2350⁷(1941).
- (40) Barnicoat C.R.,Palmer L.S., C.A. 1760⁶(1940).
- (41) Corbett W.J.,Tracy P.H., C.A. 3384²(1940).
- (42) Josephon D.V.,Doan F.J., C.A. 1758⁶(1940).
- (43) Jack ,Henderson J.L. , Food Industries 14;50;(1942).
- (44) Hollender H.A.,Tracy P.H. , J.Dairy Sci. 25;249;(1942).
- (45) Lea C.H., Jour. of the Soc.Chemical Indust. 65;N^o5;(1946).
- (46) Thiel C.F., Pont E.G., J.Council Ind.Research 18;373;(1945).

FOIPA

- (47) Chapman R.A., McFarlane V.D., Can.J.of Research. 24;47;(1946).
- (48) Gray P.P., Stone I., C.A. 3349⁶(1941).
- (49) Chapman R.A., McFarlane V.D., Can.J.of Research. 21;Sect.B;
133;(1943).
- (50) Rickenschneider R.W., Turer J., Speck R.H., Oil&Soap. 20;169;
(1943).
- (51) Report of the Committee on Analysis of Commercial Fats and Oils.
Oil&Soap. 22;101;(1945)
- (52) Lundberg W.O., Dookstader W.B., Halvorsen K.O., Jour.of the Am.
Oil Chemist's Soc. 24;89;(1947).
- (53) Fonyo A., Oil&Soap. 23;75;(1946).
-