

El ácido 2-Thiobarbitúrico en la determinación de la rancidez grasa de la leche en polvo y de la mantequilla; acción de algunos antioxidantes

JOSÉ SOLARI D'ANGELANTONIO

**Cátedra de Bromatología de la Facultad de Química y Farmacia.
Universidad de Chile. Profesor: Dr. Hermann Schmidt-Hebbel.**

Desde 1947 es conocido que el ácido 2-thiobarbitúrico reacciona con los productos de oxidación de las grasas dando una coloración rosada, directamente proporcional en su intensidad al estado de rancidez. El color producido puede fluctuar entre el rosado y el rojo intenso (4).

La primera parte del trabajo es un estudio del mecanismo químico de la acción del ácido 2-thiobarbitúrico encaminado a localizar la parte activa de la molécula por la que se efectuaría la reacción de coloración.

Efectuamos una revisión de las técnicas que aplican el "Test de ácido 2-thiobarbitúrico" (TBA) al reconocimiento de la rancidez. De ellas se logró una técnica aplicada a la determinación de la rancidez de la grasa de la leche en polvo entera y de la mantequilla. Junto con el test TBA se hizo un estudio de la influencia de diferentes antioxidantes, efectuándose las pruebas en ambientes diferentes.

Comparativamente al test TBA para la mantequilla, se aplicó el método del Índice de Peróxidos, según la técnica de Greenbank y Holm (33).

PARTE EXPERIMENTAL

I.—*Estudio del mecanismo químico de la acción del TBA.*

A través de la bibliografía consultada sobre el uso del TBA en la determinación de la rancidez oxidativa de grasas (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9), no encontramos mayores referencias sobre cuál sería la parte activa de la molécula del TBA por la que se efectuaría la reacción de coloración por los productos de oxidación de las grasas.

En la estructura del TBA (figura N° 1, fórmula I) se observa que los grupos más reaccionables de acuerdo a su condensación electrónica serían el grupo thio en el carbono 2 y los hidrógenos activos del carbono 5. Buscamos entonces dos sustancias, una que tuviera la misma estructura del ácido 2-thiobarbitúrico, pero sin el átomo de azufre, y otra que, teniendo el grupo thio, tuviera los hidrógenos activos del carbono 5 bloqueados por radicales alquílicos. Las encontramos en el ácido barbitúrico normal (II) y en el pentotal sódico (5 etil-5-isoamil-malonil-thio-urea) (III). Se descartó la posibilidad de reacción *del átomo de oxígeno del ácido barbitúrico a nivel del carbono 2*, haciendo reacciones de comparación con el "Veronal" (5,5-dietil barbitúrico), el que posee los hidrógenos del carbono 5 bloqueados por radicales etílicos y que no dió la reacción.

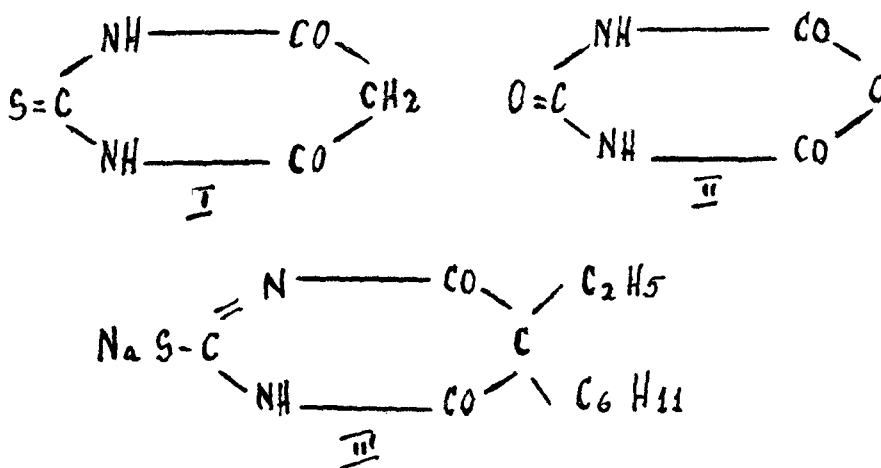


FIGURA N° 1

I.—Acido 2-thiobarbitúrico. II.—Acido barbitúrico. III.—Pentotal sódico.

Las reacciones de estas sustancias en comparación con las reacciones del TBA nos indicarían la parte de la molécula por la que se efectuaría la reacción. A partir de esta consideración, nos ajustaremos a reacciones con sustancias que presentasen funciones orgánicas similares a las que poseen las sustancias producidas en el desarrollo de la rancidez oxidativa de grasas y aceites.

Encontramos que la principal función orgánica es el grupo aldehído (30, 33, 34, 35, 36, 37, 38), pero sin dejar de considerar que para llegar a este grupo aldehído la molécula grasa pasa por una fase intermedia con formación de peróxidos e hidroperóxidos (33).

Ateniéndonos a estas consideraciones, efectuamos reacciones con las siguientes sustancias: solución acuosa al 30% de glioxal; metil-nonil-acetaldehído; benzaldehído; peróxido de benzoilo y mantequilla rancia, frente a TBA, ácido barbitúrico y pentotal sódico.

Debido a que no se pudo obtener ácido barbitúrico en el comercio, hubo necesidad de sintetizarlo. Para efectuar la síntesis del ácido barbitúrico seguimos la técnica descrita por F. Giral y C. A. Rojahn (31, 32), la que se basa en una condensación del éster malónico con urea, en un medio de alcohol etílico absoluto y en presencia de etilato de sodio. La reacción se obtiene por calentamiento a reflujo.

Procedimiento seguido para efectuar las reacciones.— Tanto el TBA como el ácido barbitúrico y el pentotal sódico se disolvieron en ácido acético glacial. Las soluciones de estas tres sustancias se hicieron reaccionar con las anteriormente señaladas en un BM hirviente durante 45'.

	Glioxal	Metil nonil acetaldehído	Benzaldehído	Peróxido	Grasa
TBA	Coloración roja	Coloración roja	pp. amarillo en frío	Coloración naranja	Color rojo
Pentotal	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Acido barbitúrico	Coloración roja	Coloración roja	pp. amarillo en frío	Coloración naranja	Color rojo

Resultados.—Los resultados obtenidos de estas reacciones se pueden observar en el cuadro adjunto.

De estos resultados se puede concluir que la reacción del TBA con los productos de oxidación de las grasas se efectúa por los hidrógenos del carbono 5.

II.—*Test TBA para la determinación de la rancidez de la leche en polvo entera.*

Se usó leche en polvo (marca Nido) obtenida en el comercio en envases de 2 kg. Con éstas se prepararon muestras a las que se les añadió sustancias antioxidantes, las cuales se agregaron por dilución con leche en polvo en un mortero.

Los siguientes antioxidantes se aplicaron en las cantidades que se indican:

Progallin LA (éster laurílico del ácido gálico), 0,07% con 0,005% de ácido cítrico (sinergista); *Progallin A* (éster etílico del ácido gálico), 0,01% con 0,005% de ácido cítrico (24, 25, 26, 27, 28, 29); *Sustane SU-3F* (compuesto por una mezcla de 66,7% de butil-hidroxianisol, 13,3% de ácido cítrico y 20% de galato de propilo); *Sustane SU-1F* (compuesto por una mezcla de 80% de 3-butil-4-hidroxianisol y 18% de 2-butil-4-hidroxianisol) (10, 20, 21); *Tenox BHA* (butil hidroxianisol), con 0,025% para los Sustanes y 0,1% con 0,005% de ácido cítrico para el Tenox BHA; *Acido nordihidro guayarético* (NDGA), 0,1% con 0,1% de ácido cítrico (10 al 23).

Series de muestras con los antioxidantes arriba señalados más las respectivas muestras control sin antioxidantes, se colocaron por un tiempo adecuado en tres ambientes: en la estufa de cultivo a 37°C., en el refrigerador a 0°C. y a la temperatura ambiente del laboratorio. El test TBA se determinó en cada muestra cada 7 días.

Técnica empleada.—De toda la bibliografía consultada sobre el uso del TBA en la determinación de la rancidez oxidativa de grasas, hemos ensayado las siguientes técnicas indicadas por: S. Patton and G. W. Kurtz (1); W. L. Dunkley and W. G. Jennings (2); A. Vargas Romero y R. G. González-Quijano (3); L. Dugan Jr. (5); C. G. Sidwell et al. (6) y M. Schwartz and B. M. Watts (9), las que presentan el inconveniente de no efectuar el calentamiento a reflujo de las sustancias re-

accionantes. Por otra parte, el uso de solución acuosa de ácido ortofosfórico nos ha dado en los ensayos en blanco valores más altos que los indicados en técnicas efectuadas sin él.

C. G. Sidwell y col. (7) realizan una destilación en arrastre de vapor de agua, determinando en el destilado el test TBA. Los valores obtenidos por nosotros fueron demasiado bajos y dispares como para poder adoptarla, sin tomar en cuenta lo engorroso del método.

Como base para nuestros trabajos nos decidimos entonces por la de T. C. Yu and Russell O. Sinnhuber (8), la que subsana los inconvenientes arriba señalados.

Reactivos:

- 1.—Solución acuosa de ácido tricloroacético al 20%.
- 2.—Solución de piridina clorhídrica (30 cc. más 70 cc. de HCL 6 N.).
- 3.—Mezcla de 650 cc. de HCL 0,6 N con 50 cc. de piridina clorhídrica y 50 cc. solución de ácido acético al 20%.
- 4.—Solución de ácido 2-thiobarbitúrico. 0,67 g. de TBA se disuelven en 70 cc. de ácido acético glacial y 2 cc. de HCL concentrado; luego se afora a 100 cc. con agua destilada.
- 5.—Eter de petróleo (Destilina).

Procedimiento.—A 3 g. de leche en polvo pesados en matraz seco de 250 cc. se agregan sucesivamente: 5 cc. de agua, 5 cc. de piridina clorhídrica, 10 cc. de solución de ácido tricloroacético al 20% y 6 cc. de solución de TBA. Se agita hasta mezclar bien. Se conecta el matraz a un refrigerante de reflujo y se coloca en un BM hirviente, calentándose durante 30' exactos. Luego se agrega por la parte superior del condensador 75 cc. de solución reactivo N^o 3. Se agita y se sigue calentando a reflujo por 10' más. Se lleva a la temperatura ambiente. Se sacan unos 40 cc. de la solución y se centrifuga en tubo seco a 3.200 r.p.m. durante 10'. Se miden unos 15 cc. del líquido claro y se agitan con 10 cc. de éter de petróleo (para clarificar), volviéndose a centrifugar a 3.200 r.p.m. durante 10'. Es importante hacer para cada serie de reacciones

un blanco. El líquido acuoso límpido se lee en el espectrofotómetro Colleman Universal modelo 14 a 535 mu. expresado en densidad óptica, o en el fotocolorímetro Klett Summerson con filtro N° 54. Se usó también el fotocolorímetro Evelyn, pero los valores por él obtenidos resultaron no reproducibles.

Resultados.—Los resultados de la acción de los diferentes antioxidantes en cada ambiente se pueden observar claramente en el cuadro N° 1. Por ser de interés incluimos la figura N° 2, la que muestra las curvas en papel milimetrado de los resultados correspondientes a las muestras de control en los tres ambientes señalados.

Del resumen de estas experiencias se puede recomendar a los antioxidantes Progallin LA (alato laurílico) y Progallin A (Galato etílico) como los antioxidantes de una acción marcada para evitar el enranciamiento de la leche en polvo por un almacenamiento prolongado en malas condiciones. Presentan la ventaja sobre los demás que hemos usado de que no alteran los caracteres organolépticos de este alimento. Sin embargo, hemos visto que la leche en polvo entera, si se guarda en un lugar seco y en envase bien cerrado, no necesita de la adición de antioxidantes para su preservación.

Determinación de un límite para la rancidez de la leche en polvo entera.

Para poder establecer un límite en la rancidez de la leche en polvo mediante el test TBA se hicieron mezclas al mortero de leche en polvo alterada y fresca. De esta manera se llegó a un porcentaje de leche en polvo alterada en la cual aparecen ya los caracteres organolépticos de sabor y olor a rancio.

Los resultados, que pueden observarse en la figura N° 3, nos dan un valor límite comprendido entre las densidades ópticas de 0,7 a 0,8, valores obtenidos en el espectrofotómetro Colleman Universal modelo 14 a 535 mu., siguiendo exactamente la técnica descrita con las cantidades allí indicadas.

CUADRO N° 1

Resultados del test TBA para leche en polvo obtenidos en el espectrofotómetro Colleman Universal modelo 14 a 535 mu, expresados en densidad óptica

En la estufa de cultivo a 37°C.						
ANTIOXIDANTES	DIAS					
	1	7	14	21	28	35
Control	0.24	0.46	0.38	0.48	0.20	0.29
Progallin A	0.23	0.42	0.36	0.46	0.14	0.26
Progallin LA	0.24	0.44	0.38	0.48	0.15	0.22
Sustane SU-1F	0.24	0.45	0.38	0.47	0.15	0.21
Sustane SU-3F	0.24	0.45	0.37	0.47	0.16	0.27
Tenox BHA	0.24	0.43	0.37	0.47	0.18	0.26
NDGA	0.23	0.44	0.36	0.46	0.14	0.22
En el refrigerador a 0°C.						
Control	0.37	0.28	0.40	0.55	0.60	0.64
Progallin A	0.36	0.26	0.37	0.52	0.56	0.60
Progallin LA	0.36	0.27	0.35	0.53	0.57	0.60
Sustane SU-1F	0.35	0.26	0.36	0.49	0.53	0.55
Sustane SU-3F	0.35	0.26	0.37	0.53	0.57	0.60
Tenox BHA	0.36	0.27	0.36	0.53	0.57	0.59
NDGA	0.30	0.25	0.37	0.49	0.53	0.57
A la temperatura ambiente del laboratorio.						
Control	0.40	0.36	0.25	0.39	0.42	0.38
Progallin A	0.32	0.28	0.25	0.30	0.34	0.28
Progallin LA	0.39	0.33	0.23	0.33	0.37	0.29
Sustane SU-1F	0.23	0.20	0.17	0.22	0.28	0.30
Sustane SU-3F	0.33	0.30	0.21	0.30	0.34	0.36
Tenox BHA	0.37	0.32	0.27	0.35	0.38	0.31
NDGA	0.38	0.33	0.26	0.36	0.39	0.35

III.—Test TBA para la determinación de la rancidez de la manteca.

Se usó manteca (marca Delicias) con no más de un día transcurrido desde su fabricación. Se prepararon muestras con sustancias antioxidantes, las que se añadieron disueltas en alcohol etílico a la manteca fundida. Se expulsó el alcohol calentando suavemente al BM y agitando.

Los antioxidantes usados fueron los siguientes: 0,01% de Progallin LA, 0,025% de Sustane SU-3F, 0,01% de Tenox BHA y 0,01% de NDGA. Con excepción del Sustane, los tres otros antioxidantes se adicionaron además de 0,005% de ácido cítrico como sinergista.

Series de muestras con los antioxidantes señalados, más las muestras de control, se colocaron por un tiempo adecuado en dos ambientes: en la estufa de cultivo a 37°C. y a la temperatura ambiente del laboratorio. El test TBA se aplicó a cada muestra cada dos días.

Técnica empleada.—Para la determinación de la rancidez oxidativa de la mantequilla mediante el test TBA se midió un cc. de mantequilla fundida con una pipeta terminada en un cuentagotas de boca ancha, teniendo cuidado de hacer caer la mantequilla al fondo de un matraz de 250 cc. Luego se siguió la técnica descrita para la leche en polvo.

Las lecturas se efectuaron igualmente con el espectrofotómetro Coleman Universal modelo 14 a 535 mu. y en el fotolorímetro Klett Summerson con filtro N° 54.

Resultados.—Se puede apreciar claramente en el cuadro N° 3 el desarrollo de la rancidez de la mantequilla controlado mediante el test TBA.

En la figura N° 4 se observan las curvas correspondientes a las muestras de control. Las características de estas curvas corresponden a similares encontradas en la bibliografía (9).

De los antioxidantes ensayados, el NDGA a una proporción de 0,01%, con 0,005% de ácido cítrico como sinergista, los caracteres organolépticos causan una pequeña alteración en el sabor, que estimamos sin importancia. No se observaron cambios de color en la mantequilla por la adición de estas sustancias antioxidantes.

La determinación de un límite para la rancidez de la mantequilla mediante el test TBA se logró con muestras sin antioxidantes dejadas a la temperatura ambiente del laboratorio. Así, después de 9 días, comenzaron a acusar caracteres organolépticos correspondientes a mantequilla rancia. A esta altura, el test TBA en el espectrofotómetro nos dió valores expresados en densidad óptica comprendidos entre 0,25 y 0,30 a 535 mu.

El límite estaría entonces señalado por esta zona de densidad óptica. A pesar de no ser un valor absoluto, es una medida de la rancidez que, ceñida a la técnica descrita, aporta una valiosa ayuda en el control bromatológico.

CUADRO N° 2

Resultados del test TBA para mantequilla obtenidos en el espectrofotómetro Coleman Universal modelo 14 a 535 m μ , expresados en densidad óptica

En la estufa de cultivo a 37°C.							
Antioxidantes	DIAS						
	1	3	5	7	9	11	13
Control	0.16	0.19	0.22	0.30	0.34	0.38	0.44
Progallin LA	0.13	0.05	0.04	0.09	0.16	0.24	0.28
Sustane SU-3F	0.13	0.05	0.03	0.09	0.14	0.21	0.25
Tenox BHA	0.13	0.05	0.03	0.08	0.13	0.20	0.23
NDGA	0.12	0.05	0.03	0.08	0.12	0.19	0.24
A la temperatura ambiente del laboratorio.							
Control	0.10	0.11	0.13	0.16	0.21	0.25	0.30
Progallin LA	0.08	0.07	0.03	0.04	0.07	0.10	0.15
Sustane SU-3F	0.08	0.06	0.02	0.03	0.06	0.09	0.13
Tenox BHA	0.08	0.06	0.02	0.03	0.05	0.09	0.12
NDGA	0.08	0.06	0.02	0.03	0.05	0.08	0.12

CUADRO N° 3

Resultados de la determinación del Índice de Peróxidos aplicada a la mantequilla, expresados en milimoles por kilogramo de grasa

En la estufa de cultivo a 37°C.							
Control	0.64	1.03	0.97	1.46	1.58	1.82	1.84
Progallin LA	0.53	0.64	0.75	1.07	1.35	1.54	1.76
Sustane SU-3F	0.52	0.62	0.77	1.08	1.36	1.58	1.78
Tenox BHA	0.50	0.66	0.74	1.04	1.34	1.55	1.77
NDGA	0.50	0.62	0.72	1.00	1.30	1.52	1.73
A la temperatura ambiente del laboratorio.							
Control	0.50	0.58	0.77	1.04	1.35	1.54	1.63
Progallin LA	0.44	0.28	0.38	0.30	0.47	0.72	0.92
Sustane SU-3F	0.45	0.27	0.35	0.31	0.49	0.73	0.95
Tenox BHA	0.42	0.24	0.37	0.30	0.48	0.71	0.93
NDGA	0.39	0.22	0.32	0.28	0.44	0.68	0.92

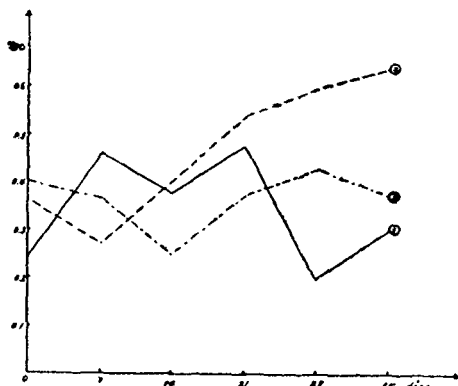


FIGURA N° 2

Test TBA determinado en el espectrofotómetro Colleman 535 mu. de las muestras de control de leche en polvo. 1) En la estufa de cultivo a 37°C. 2) En el refrigerador a 0°C. 3) A la temperatura ambiente del laboratorio.

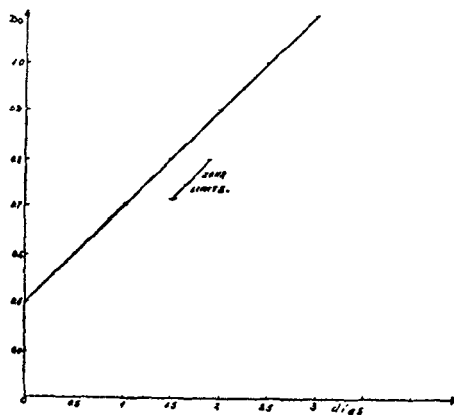


FIGURA N° 3

Test TBA determinado en el espectrofotómetro Colleman 535 mu. de las muestras de control de leche en polvo alterada en mezcla con leche en polvo fresca. Zona límite para rancidez entre 0.7 a 0.8 (D. O.).

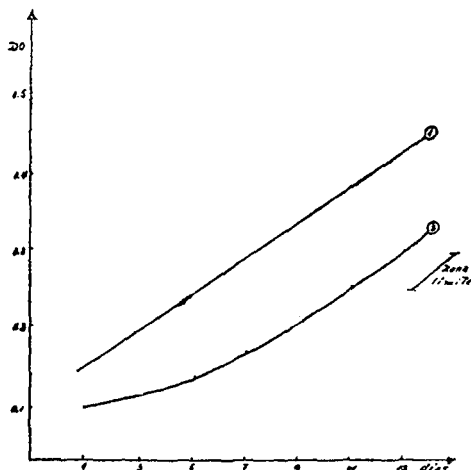


FIGURA N° 4

Test TBA determinado en el espectrofotómetro Colleman 535 mu. de las muestras de control de mantequilla. 1) En la estufa de cultivo a 37°C. 2) A la temperatura ambiente del laboratorio. Zona límite para rancidez entre 0.25 a 0.30 (D. O.).

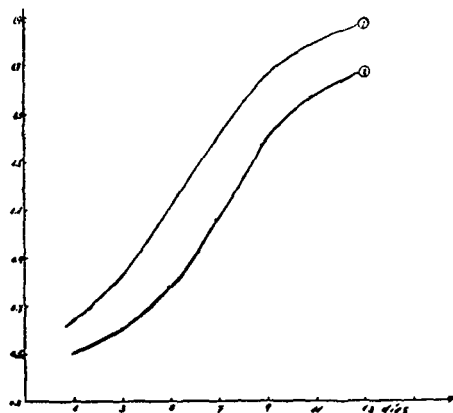


FIGURA N° 5

Indice de Peróxidos expresados en milimoles por kilogramo de grasa para muestras de control de mantequilla. 1) En la estufa de cultivo a 37°C. 2) A la temperatura ambiente del laboratorio.

CONCLUSIONES

1.—El estudio del mecanismo de la acción del TBA en el reconocimiento de la rancidez demostró que la reacción con los productos de oxidación de las grasas se efectúa por los átomos de hidrógeno a nivel del carbono 5 de este reactivo.

2.—La aplicación de las diferentes técnicas propuestas por la literatura para determinar el test TBA nos ha llevado a la conclusión de aplicar el procedimiento propuesto por T. C. Yu and Russell O. Sinnhuber (8) para el control de productos de pescado y que nosotros hemos modificado para el estudio de la rancidez de la leche en polvo y mantequilla.

3.—Estudios comparativos de la apreciación de los caracteres organolépticos con la intensidad de la coloración en el test del TBA, nos permitieron establecer un límite que podría tomarse en forma aproximada para el control bromatológico, tanto de la leche en polvo entera como de la mantequilla. Dichos límites quedarían entre 0,7 a 0,8 para la leche en polvo y 0,25 a 0,30 para la mantequilla. Estas cifras corresponden a densidades ópticas obtenidas en el espectrofotómetro Coleman Universal modelo 14 a 535 μ .

4.—También se efectuó una comparación entre el Índice de Peróxidos y el test TBA para el control bromatológico de la mantequilla. A este respecto se ha podido establecer que ambos índices coinciden dentro de un rango aceptable, al considerar el límite para un lípido normal de 1 a 1,5 milimol por gramo de grasa (35).

SUMMARY

A study of the chemical mechanism of the action of 2-thio-barbituric acid was made in order to find out what part of the molecule reacts with the oxidation products of fats.

This reagent was used to determine the limits of oxidative rancidity in whole powdered milk and butter by the method described in this paper.

On the test for butter the peroxide index was determined at the same time as the 2-thio-barbituric acid test.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Reaktionsmechanismus von 2-Thiobarbitursäure mit ranzigen Fetten wurde untersucht, um festzustellen welcher Teil des Moleküls an der Reaktion beteiligt ist. Sodann wurde mit Hilfe der vorgeschlagenen Modifikation der Reaktion die untere Grenz der Empfindlichkeit in der Untersuchung von Trockemilch und Butter untersucht. Bei den Untersuchungen an Butter wurde zu Vergleichswecken gleichzeitig der Peroxyd - index bestimmt.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Stuart Patton and Kurtz, G. W. 2-thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.*, 34-669 (1951).
- 2.—Dunkley, W. L. and Jennings, W. G. A procedure for application of the thiobarbituric acid test to milk. *J. Dairy Sci.*, 34-1064 (1951).
- 3.—Vargas Romero, A. y González-Quijano, R. G. Ensayo sobre enranciamiento de la manteca de cerdo. II. La prueba del ácido 2-thiobarbitúrico. *Grasas y aceites. Sept.-Oct. Vol. 7* (1956).
- 4.—Jennings, W. G.; Dunkley, W. L. and Reiber, H. G. Studies of certain red pigments formed from 2-thiobarbituric acid. *Food Research*, 20-13 (1955).
- 5.—Dugan Jr., L. Stability and rancidity. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 32-605 (1955).
- 6.—Sidwell, C. G.; Salwin, H.; Benca, M.; Mitchell Jr., J. M. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 31-603 (1954).
- 7.—Sidwell, C. G.; Salwin, H. and Mitchell Jr., J. M. Measurement of oxidation in dried milk products with thiobarbituric acid. *J. Am. Oil Chemist' Soc.* 32-13 (1955).
- 8.—Yu, T. C. and R. O. Sinnhuber. 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. *Food Technology*. 11-104 (1957).
- 9.—Schwartz, M. and Watts, B. M. Application of the thiobarbituric acid test as a quantitative measure of deterioration in cooked oysters. *Food Research*. 22-76 (1957).
- 10.—Mendoza Galindo, Silvia. Estudio de métodos para detectar rancidez. Acción antioxidante del ácido nordihidroguayarético y del galato de propilo. Tesis de Químicos Farmacéuticos. Vol. III (1951).
- 11.—Lundberg, W. O.; Halvorson, H. O. and Burr, G. O. The antioxidant properties of nordihydroguayaretic acid. *Oil and Soap*. 21-33 (1944).
- 12.—Stull, J. W.; Herreid, E. O. and Tracy, P. H. A study of the use of the antioxidant nordihydroguayaretic acid in dairy products. III. Its antioxygenic properties in sweetened frozen cream. *J. Dairy Sci.* 32-301 (1949).

- 13.—Stull, J. W.; Herreid, E. O. and Tracy, P. H. A study of the effect of nordihydroguayaretic acid on the oxygen absorption of the phospholipid fraction of milk. II. The effect of synergist, metallic catalysts and pH. *J. Dairy Sci.* 34-87 (1951).
- 14.—Stull, J. W.; Herreid, E. O. and Tracy, P. H. A study of the effect of nordihydroguayaretic acid on the oxygen absorption of the phospholipid fraction of milk. I. The effect of concentration of antioxidant. *J. Dairy Sci.* 34-181 (1951).
- 15.—Stull, J. W.; Herreid, E. O. and Tracy, P. H. A study of the use of the antioxidant nordihydroguayaretic acid in dairy products. 1. Its antioxygenic properties in milk. *J. Dairy Sci.* 31-449 (1948).
- 16.—Stull, J. W.; Herreid, E. O. and Tracy, P. H. A study of the use of the antioxidant nordihydroguayaretic acid in dairy products. II. Its antioxygenic properties in unsweetened frozen cream. *J. Dairy Sci.* 31-1024 (1948).
- 17.—Stull, J. W.; Herreid, E. O. and Tracy, P. H. A study of the use of nordihydroguayaretic acid in dairy products. IV. Its antioxygenic properties in spray-dried whole milk and ice cream mix with and without added synergist. *J. Dairy Sci.* 34-80 (1951).
- 18.—Dassow, J. A. and Stausby, M. E. Stabilization of Vitamin A in halibut liver oil with nordihydroguayaretic acid (NDGA). *J. Am. Chemists' Soc.* 26-475 (1949).
- 19.—Dugan, L. R.; Hoffert, E.; Blumer, G. P.; Dabkiewies, I. and Kraybill, H. R. The antioxidant behavior of the isomers of butylated hidroxyanisole. *J. Am. Chemists' Soc.* 28-493 (1951).
- 20.—Dugan, L. R.; Kraybill, H. R.; Ireland, L. and Vibrans, F. C. Butylated hidroxyanisole an antioxidant for fats and foods made with fat. *Food Technology* 4-457 (1950).
- 21.—Kraybill, H. R. Butylated hidroxy anisole as an antioxidant for animal fats. *J. Am. Chemists' Soc.* 26-449 (1949).
- 22.—Dugan Jr., L. R. Butylated hidroxytoluene. *Am. Meat Inst. Foundation, Bulletin No. 18*, June (1954).
- 23.—Gearbart, W. M. Effect of antioxidants on the stability of orange oil. *Food Technology.* 11-260 (1957).
- 24.—Findlay, J. D. Experiments on the use of antioxidants in spray-dried whole milk powder. *J. Dairy Research.* 14-165 (1945).
- 25.—Esteres del ácido gálico como antioxidantes. Información proporcionada por el Depto. Científico de la "Nipa" Laboratories Ltd. Treforest Trading State, Cardiff. Enero de 1955.
- 26.—Progallin A. Progallin P. Boletín de "Nipa" Laboratories Ltd. Treforest Trading State, Cardiff.
- 27.—Los galatos de octilo y de dodecilo en la lucha contra la rancidez de las grasas. Boletín editado por "N. V. Chemische Fabrick. Naarden - Holanda."
- 28.—Morris, S. G. Antioxidant properties of the fatty alcohol esters of gallic acid. *J. Am. Chemists' Soc.* 24-309 (1947).
- 29.—Morris, S. G. Antioxidant properties of polyhydroxybenzoic acids and their esters, and other nuclear substituted polyphenols. *J. Am. Chemists' Soc.* 26-638 (1949).

- 30.—West, E. S. and Todd, W. R. Textbook of Biochemistry. 2^a Ed. Macmillan Comp. New York. 1955.
- 31.—Giral, F. y Rojahn, C. A. Productos Químicos y Farmacéuticos. Vol. III. Ed. Atlante, S. A. México, D. F. 1946.
- 32.—Vitoria, E. Prácticas Químicas. Ed. Tip. Cat. Casals. Barcelona. 1942.
- 33.—Schmidt-Hebbel, H. Tratado de Bromatología. Santiago. 1952.
- 34.—Goded, A. y Mur. Industrias derivadas de la leche. Salvat Editores (1954).
- 35.—Lea, C. H. Rancidity in edible fats. Chemical Publishing Co. Inc. New York (1939).
- 36.—Riemenschneider, R. W. Oxidative rancidity and the use of antioxidants. Transactions. Am. Assoc. of Cereal Chemists. 5, N^o 1 (1947).
- 37.—Privett, O. S. The relation of synergist to antioxidant in fats. J. Am. Chemists' Soc. 31-321 (1954).
- 38.—Privett, O. S. Reactions of phosphoric acid in the antioxidant of fats. J. Am. Chemists' Soc. 31-225 (1954).