

ESTUDIOS SOBRE ACIDOS HIDROXAMICOS

IX. Microrreconocimiento y valoración de ácido fórmico y formiatos inorgánicos. Su aplicación a productos alimenticios *

POR LOS DOCTORES

OMAR A. GUAGNINI ** y EUGENIO E. VONESCH ***

El reconocimiento y valoración del ácido fórmico y sus sales, tiene un interés permanente en muchos problemas biológicos, ya sea relacionado con cuestiones teóricas, ya con aplicaciones prácticas. En todas ellas, la valoración de microcantidades es una condición indispensable, habiéndose adaptado diversos macrométodos como micrométodos; sin embargo, en medios complejos sigue siendo necesario disponer de procedimientos sensibles y al mismo tiempo específicos.

La conversión de los ácidos carboxílicos en ésteres y su posterior identificación como derivados hidroxámicos, fue propuesta como prueba específica para aquellos. La imposibilidad de convertir los ácidos carboxílicos directamente en derivados hidroxámicos, exige su previa transformación en cloruro de acilo mediante el cloruro de tionilo, y recién entonces con la hidroxilamina producir los compuestos hidroxámicos. En esta técnica debe tenerse en cuenta como causa de error, la acción del reactivo halogenante sobre los α -hidroxiácidos capaces de engendrar ácido fórmico, un aldehído o una cetona. Si bien las condiciones establecidas no buscan la especificidad para un determinado ácido carboxílico, la reacción es valiosa por su elevada sensibilidad, que es infe-

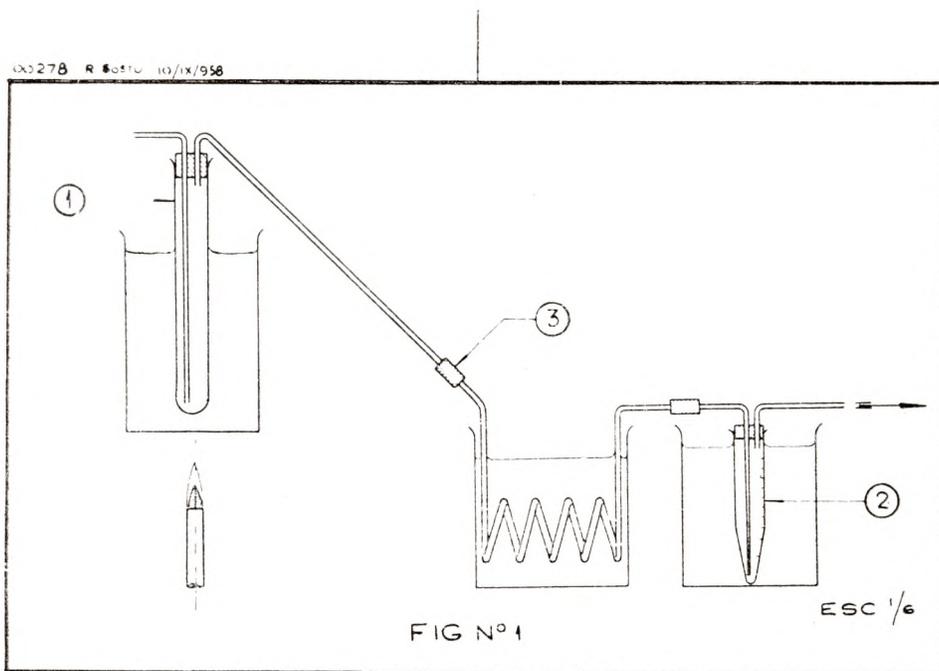
* Compendio del trabajo publicado en *Mikrochimica Acta* (Viena), 612 (1958).

** Jefe del Gabinete Químico de la Policía Federal. Dirección de Investigaciones.

*** Profesor de Química Orgánica y Biológica.

rior a 10 μg . La obtención relativamente sencilla del ácido formohidro-xámico a partir de los ésteres fórmicos, fue estudiada por nosotros en una comunicación anterior, estableciendo las condiciones necesarias de especificidad. En el presente trabajo, se describe una microtécnica fotocolorimétrica para su evaluación en productos alimenticios, la que se caracteriza por su sencillez, rápida ejecución y por la pequeña cantidad de muestra necesaria.

Este procedimiento exige la esterificación del ácido a formiato de etilo, su destilación, recepción en solución de hidroxilamina amoniacal,



para su conversión en formohidro-xámico y finalmente su reconocimiento y valoración fotocolorimétrica como quelato férrico. La técnica indicada permite apreciar un mínimo de 2 μg de ácido fórmico en un volumen de 4 ml.; siendo la coloración del formohidro-xamato férrico visible hasta una dilución límite de 0,5 partes por millón. La valoración fotocolorimétrica está adaptada a la escala macro, con un volumen final de 10 ml., lo cual permite determinar entre 50 y 500 μg de ácido fórmico, en condiciones de especificidad, en presencia de otros ácidos carboxílicos o de formaldehida o α -cetoácidos. Los ensayos de recuperación alcanzan el 95 % de las cantidades agregadas.

La resolución de casos de mezclas de ácido fórmico y formiatos inorgánicos, se logra de una manera sencilla, aprovechando la volatilidad del ácido fórmico y de sus ésteres, y en la reacción de hidroxilaminólisis selectiva de estos últimos. La aplicación del método a productos alimenticios no exige preparación previa de la muestra y ha demostrado su flexibilidad para adaptarlo a diversos tipos de productos, prestándose para análisis de rutina.

CUADRO N^o 1

DETERMINACION DEL ACIDO FORMICO EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS

Producto	Cantidad de Producto tomada	Cantidad de ácido fórmico contenida en μg	Cantidad de ácido fórmico por 100 g ó ml de muestra en mg
Ajíes encurtidos (líquido)	0,2 ml.	30	15
Carne de bovino (fresca)	870 mg.	—	—
Dulce de leche	926 mg.	221	45
Dulce de membrillo	1333 mg.	50	3,7
Condimento (ketchup)	266 mg.	66	24,4
Chuerut (líquido)	1 ml.	—	—
Embutido (ahumado)	638 mg.	92	14,4
Extracto de carne	490 mg.	221	45
Extracto de tomate	749 mg.	96	12,9
Miel	1016 mg.	102	10
Pescado ahumado (lisa)	784 mg.	69	8,8
Pickles (líquido)	0,3 ml.	62	20,7
Vino (tipo oporto)	0,9 ml.	100	11,1
Zumo de limón	1 ml.	—	—
Zumo de mandarina	0,5 ml.	47	9,4

Técnica. — El procedimiento de reconocimiento cualitativo y el de la valoración son muy similares y utilizan el mismo aparato de destilación, figura N^o 1. En el tubo I se dispone un volumen de muestra no mayor de 1 ml., se agregan 0,4 ml. de ácido sulfúrico 6 N y 3 a 4 ml. de etanol exento de ésteres. Poner en el tubo colector II, 0,3 ml. de reactivo de hidroxilamina y una gota de amoníaco concentrado¹. Conectar el aparato en el sistema de aspiración, colocando el tubo I en el baño maría y los otros dos en los baños de hielo. Producir una suave aspiración e iniciar el calentamiento del baño maría hasta alcanzar 70° C en unos 10 minutos. En este lapso destilan 1,5 a 2 ml. del líquido contenido

¹ Disolver 7 gs. (0,1 mol.) de clorhidrato de hidroxilamina en 85 ml. de etanol de 70 %, se le agregan 5 a 6 gotas de fenolftaleína al 0,5 % y se alcaliniza con hidróxido de sodio al 40 %. Se decolora la fenolftaleína con gotas de ácido clorhídrico y se completa con agua destilada hasta 100 ml.

en I. Desconectar la unión 3 y agregar por ella mediante pipeta, 0,5 ml. de etanol para lavar el tubo serpentín aprovechando la aspiración para reunirlo con el destilado recogido en el tubo II. Finalmente agregar 2 a 3 ml. de solución de perclorato de hierro².

Una coloración rojo violada indicará la existencia de ácido fórmico.

La técnica cuantitativa se practica de la misma manera, pero se agregan 4 ml. de reactivo revelador en vez de 2 a 3 ml., y se completa con etanol hasta 10 ml., realizando luego una lectura con fotocolorímetro dentro de un plazo de 5 minutos. Con este procedimiento se valoró el contenido en ácido fórmico en diversos productos alimenticios con los resultados que se detallan en el cuadro N^o 1.

R E S U M E N

Se ha estudiado el reconocimiento y la valoración del ácido fórmico en microcantidades para medios complejos, proponiéndose una técnica sencilla, de rápida ejecución y aplicable a pequeñas cantidades de muestras.

El procedimiento se basa en la esterificación del ácido fórmico a formiato de etilo, su destilación, su recepción en solución de hidróxilamina amoniaca para su conversión en ácido formohidroxámico y finalmente su reconocimiento o su valoración fotocolorimétrica como quelato férrico. Se usa un aparato de microdestilación construido con un tubo de ensayos donde se efectúa la esterificación y la destilación simultáneamente, arrastrando los ésteres formados mediante aspiración con aire; se los recoge, previo pasaje por un serpentín, en un tubo cónico donde se efectúa la hidroxilaminólisis del éster fórmico en condiciones de especificidad. En el mismo tubo se revela la presencia del formohidroxámico por adición de perclorato férrico que desarrolla el color del quelato, apto para ser valorado fotocolorimétricamente. El método permite reconocer 2 µg de ácido fórmico en un volumen final de 4 ml. La valoración fotocolorimétrica se ha adaptado para cantidades entre 50 y 500 µg de ácido fórmico o formiatos inorgánicos. Otros ácidos carboxílicos, α-cetoácidos, aldehidos y glúcidos reductores, no son causa de error. Los casos de mezclas de ácido fórmico, formiatos metálicos y ésteres fórmicos, se resuelven sin dificultad. La valoración del ácido fórmico en diversos productos alimenticios (encurtidos, extracto

² Este reactivo se prepara disolviendo 0,8 gs. de hierro porfirizado en 10 ml. de ácido perclórico al 70 %, agregando a continuación 10 ml. de agua y completando con etanol a 100 ml. De esta solución se prepara el reactivo revelador tomando 5 ml., a los que se agregan 10 ml. de ácido perclórico al 70 % y se completa con etanol de 95 % a 100 ml.

de carne, extracto de tomate, dulce de leche, dulce de membrillo, embutido, pescado ahumado, miel, vino, zumos de mandarina y limón), muestras tenores variables entre 0 y 45 miligramos por cien gramos de muestra.

Studies on Hydroxamic Acids

IX. MICRODETECTION AND ESTIMATION OF FORMIC ACID AND INORGANIC FORMATES. THEIR APPLICATION ON FOODS.

S U M M A R Y

The detection and determination of micro amounts of formic acid in complex substances was studied, and a simple, rapid procedure was worked out that can be applied to small amounts.

The procedure is based on the esterification of the formic acid to ethyl formate, whose distillation into ammoniacal hydroxylamine solution yields formhydroxamic acid which can then be detected or determined photometrically as the iron (III) chelate compound. A micro distilling apparatus is used consisting of a test tube, from which the esterification and the distillation are accomplished simultaneously, the resulting ester being carried along by the current of air. After passing through a cooling tube, the formic ester is trapped in a conical tube, where the hydroxylaminolysis is accomplished in a specific manner. The presence of the formhydroxamate is revealed, after adding Fe (III) perchlorate, by the color of the chelate, which is suitable for photometric determination. The method permits the detection of quantities of 2 μg formic acid in a final volumen of 4 ml. The photometric determination was conducted with amounts between 50 and 500 μg of formic acid or inorganic formates. Other carboxylic acids, α -keto acids, aldehydes and reducing sugars do not interfere. Likewise, no difficulties are caused by mixtures of formic acid, metal formates and formic acid esters.

The determination of formic acid in various foodstuffs (preserves, meat extract, tomato extract, confectionery goods, quince jam, sausages, smoked fish, honey, wine, orange and lemon juice) showed amounts between 0 and 45 mg formic acid in 100 g of sample.

BIBLIOGRAFIA

1. AHLÉN, L. y SAMUELSON, O. *Anal. Chem.*, **25**, 1263 (1953).
2. A. O. A. C. "Official and Tentative Methods of Analysis" 7 Ed. Washington (1950).
3. BASTRUP, J. TH. — *Acta Pharmacol and Toxicol.*, **3**, 303 (1947).
4. BENEDICT E. M. y HARROP G. A. *J. Biol. Chem.*, **54**, 443 (1922).
5. BUCKLESS, R. E. y TELEN, C. J. *Anal. Chem.*, **22**, 676 (1950).

6. CHERONIS, N. D. y ENTRIKIN, J. B. *Semi-micro Qualitative Organic Analysis*. 2 Ed. Interscience Publ. C. New York (1957).
7. DAKIN, H. D., JANNEY, N. W. y WAKEMAN, A. J. *J. Biol. Chem.*, 14, 341 (1913).
8. DROLLER, H. *Z. Physiol. Chem.*, 211, 57 (1932).
9. FEIGL, F. ANGER V. y FREDEN, V. O. *Microchemie*, 18, 15 (1934).
10. GRANT, W. M. *Anal. Chem.*, 19, 206 (1947).
11. GRANT, W. M. *Anal. Chem.*, 20, 267 (1948).
12. GROSSFELD, J. y PAYFER, R. *Z. Untersuch. Lebensmitt*, 78, 1 (1938).
13. GUAGNINI, O. A. y VONESCH, E. E. *Mikrochim. Acta (Wien)*. 1767 (1956); *Anal. Asoc. Quím. Arg.* 44, 195 (1956).
14. HOUBEN-WEYL. "*Methoden der organischen Chemie*". 4ª Ed. G. Thieme V. Stuttgart (1958).
15. JONES, H. C. *Am. Chem. J.*, 17, 539 (1895).
16. KRAUSE, A. C. y WECKERS, R. *Arch. Ophthalmol. (N.S)*, 3, 225 (1939).
17. PORTER y RUYSEN. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, París, 82, 1504 (1876).
18. RIESSER, O. *Z. Physiol. Chem.*, 96, 355 (1915-16).
19. SNELL, F. D. y SNELL, C. "*Colorimetric Methods of Analysis*". 4ª Ed. V. Noshand C. Inc. New York (1954).
20. SUTTON, L. "*Volumetric Analysis*", Philadelphia (1924).
21. VONESCH, E. E. y GUAGNINI, O. A. *Mikrochimica. Acta (Wien)* (1958); *Anal. Asoc. Quím. Arg.* 45, 84 (1957).