

Estudios sobre ácidos hidroxámicos

X. Microvaloración de radical acetilo en pectinas *

POR

EUGENIO E. VONESCH **, OMAR A. GUAGNINI *** Y MARIA H. C. K. DE RIVEROS ****

El radical acetilo es un componente habitual de la molécula de pectina. Se lo encuentra en proporciones variables, del 2 al 40 ‰ de acuerdo con el origen y con el procedimiento empleado para la extracción y purificación de la pectina. Se admite que el radical acetilo se halla fijado en algunos de los eslabones del poligalacturónido, esterificando la función alcohólica del carbono N.º 2. Además posee la molécula de pectina una cantidad variable de grupos oximetílicos, unidos éstos a la función carboxílica correspondiente al ácido péctico. La proporción en la pectina de estos radicales, acetilo y metoxilo, permite deducir informaciones acerca del origen, del tratamiento sufrido para la extracción y purificación, y de los posibles empleos en productos alimenticios o industriales.

Los métodos empleados para la valoración del radical acetilo en pectinas, en general, no son específicos ni suficientemente sensibles para determinarlo en microescala. Hace excepción a ello en ciertos aspectos la técnica propuesta por McComb y McCready. Este último método se basa en realizar la hidroxilaminólisis de la pectina en medio alcalino, con lo cual el grupo acetilo resulta convertido en el ácido acetohidroxámico. A continuación se agrega sal férrica, se separa por filtración el acetohidro-

* Compendio del trabajo publicado en: *Anales de la Asociación Química Argentina* 48, 117, 1960.

** Profesor de química biológica.

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

**** Jefe de trabajos prácticos de química biológica.

xamato férrico soluble, de los compuestos insolubles, y se valora su intensidad cromática por fotometría.

El estudio realizado sobre la valoración de ésteres fórmicos por hidroxilaminolisis, permitió establecer también las bases para una técnica general de microvaloración del grupo N-acetilo y O-acetilo en compuestos orgánicos, cuya publicación se halla en preparación.

Ella se ha adaptado en este trabajo, para microvaloración particular del radical acetilo en pectinas. Los ensayos comparativos de los resultados obtenidos con el método de McComb y McCready, y otro desarrollado por nosotros, permitió observar diferencias significativas de valores, especialmente con algunas muestras de pectinas de distintas calidades. La investigación sistemática acerca de las causas de estas discrepancias entre ambas técnicas, reveló que la purificación sucesiva con etanol de 70 %, permitía separar a medida que progresaba el tratamiento, fracciones insolubles que mostraban una constante disminución de las diferencias; de esta manera llegábase a obtener iguales valores. Estas diferencias deben atribuirse a la presencia de ácidos pectohidro-xámicos solubles, generados conjuntamente con el ácido acetohidro-xámico, durante el proceso de hidroxilaminolisis y que en la técnica por este proceso, se expresaban sumados al ácido acetohidro-xámico.

Otro hecho observado aplicando el método de McComb y McCready con algunas pectinas, era la aparición de una coloración final que no correspondía exactamente con el color rojo violado, característico del acetohidro-xamato de hierro. Esta coloración caoba, más estable, se desarrollaba conjuntamente con la otra. Su origen debe atribuirse a impurezas que existen en ciertas pectinas coloreadas, pero que en otras puede ser causada por compuestos originados durante la hidroxilaminolisis. Estas observaciones señalaron la conveniencia de evitar la acción directa de la hidroxilamina sobre las pectinas, ya que ella no se detiene sobre el radical acetilo, sino que actúa sobre otras partes de la molécula. También la sal de hierro agregada para desarrollar el quelato, es un reactivo cromático para otras funciones. Por ello el método propuesto por McComb y McCready, si bien es sencillo, rápido y aplicable a pequeñas cantidades de pectinas, no resulta adecuado para todos los tipos de muestras.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos:

Aparato de microdestilación constituido por un tubo de ensayos, serpentín condensador y tubo colector de forma cónica, conectado a

un sistema de aspiración de diez litros de capacidad. Un esquema del aparato figura en el trabajo N.º 9 de esta serie.

Fotómetro Pulfrich, preparado con filtro S 53.

Valoración del acetilo en pectinas.

Disponer en el tubo de ensayos N.º 1, 20 a 40 mg. de pectina o 3 a 5 ml. de solución de pectina conteniendo una cantidad equivalente. Si la muestra es sólida, deben agregarse unos 3 ml. de agua destilada. Añadir a la pectina dos gotas de hidróxido de sodio al 10 %, verificando su alcalinidad con fenoltaleína y mantener a temperatura ambiente por unos 30 minutos para permitir la hidrólisis. Pasando este tiempo, agregar 0,5 ml. de ácido sulfúrico 6/N y unos 4 ml. de etanol de 95 %, exento de ésteres. Preparar el tubo colector N.º 2 con 0,3 ml. de solución de clorhidrato de hidroxilamina al 7 % en etanol de 70 %, neutra o débilmente clorhídrica y 0,2 ml. de hidróxido de sodio al 10 %. Armar el aparato conectándolo a un sistema de aspiración constituido por un frasco de Mariotte de 10 litros de capacidad. Colocar el tubo destilador N.º 1 en un baño maría y el condensador y el tubo colector en sendos baños de agua con hielo. Producir una suave aspiración e iniciar el calentamiento del baño maría hasta alcanzar 75 - 80° C. en unos 10 minutos. Mantener esta temperatura y recoger unos 3,5 ml. de destilado. La destilación por arrastre dura de 30 a 40 minutos, debiéndose graduar el pasaje de aire a unos 250 ml. por minuto. Terminada la destilación y manteniendo la corriente de aire, separar el tubo destilador y lavar el resto del aparato con 0,5 ml. de etanol, los que pasan por el serpentín y se reúnen al contenido del tubo colector. Separar el tubo graduado colector y añadirle 3 ml. de reactivo perclorato férrico, y completar con etanol de 95 % hasta un volumen final de 10 ml. El reactivo perclorato férrico se prepara tomando 5 ml. de una solución de perclorato férrico, 10 ml. de ácido perclórico purísimo de 60 - 70 % y completado con etanol de 95 % hasta 100 ml. La solución de perclorato férrico se prepara por disolución de 0,8 g. de hierro reducido y porfirizado p. a. en 10 ml. de ácido perclórico purísimo de 60 - 70 % con 10 ml. de agua destilada y agregando luego etanol de 95 % hasta completar 100 ml.

Finalmente se homogeniza el líquido contenido en el tubo colector y se realiza la lectura fotométrica. La comparación se efectúa frente a un blanco preparado mezclando todos los reactivos en volúmenes iguales a los empleados en el ensayo.

Cálculos.

La lectura fotométrica se expresa en microgramos de radical acetilo mediante la curva de titulación establecida con cantidades conocidas de acetato de etilo tomado como patrón. Se relacionan los valores de acetilo hallados para la cantidad de pectina tomada y se los expresa en porcentajes. (Fig. N.º 1).

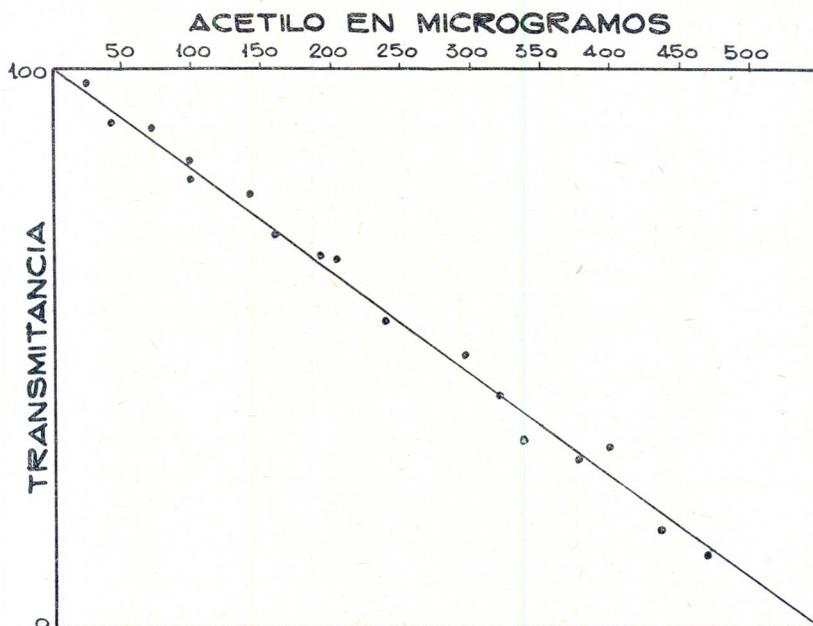


Fig. 1 — Curva de titulación fotométrica del radical acetilo.

En el cuadro N.º 1 se detallan resultados de valoraciones de radical acetilo en distintas pectinas, por hidroxilaminólisis directa y por destilación e hidroxilaminólisis del acetato de etilo, de acuerdo con la técnica que se propone.

Dada la naturaleza coloidal de la mayoría de las soluciones de pectinas y su lenta dispersión en agua, pueden producirse errores groseros si las muestras empleadas no son homogéneas.

CUADRO N.º 1

DETERMINACIÓN DE ACETILO EN PECTINAS

Origen	Presentación	Origen comercial	ACETILO EN G %	
			Hidroxilaminólisis directa	Destilación e hidroxilaminólisis
Citrus	Seca	EE. UU.	0,085	0,080
»	»	»	0,120	0,128
»	»	»	0,320	0,142
»	»	»	0,220	0,140
»	»	»	0,294	0,125
»	»	»	0,314	0,204
»	»	Argent. (Sanderson)	0,095	0,084
»	»	»	0,080	0,081
Manzana	»	»	0,160	0,087
»	»	»	0,212	0,107
»	»	» (Frubé)	0,125	0,123
»	»	» «	0,235	0,220
»	»	» (Sudangel)	0,105	0,059
»	»	EE. UU. (Takamine)	0,090	0,052

Consideraciones.

La acción de la hidroxilaminólisis sobre la pectina es completa y conduce a la formación de dos tipos de ácidos hidroxámicos por su reacción con las funciones éster de la molécula. Uno originado por el radical acetilo generando el ácido acetohidroxámico y el otro derivado del ácido galacturónico que da diversos ácidos pectohidroxámicos solubles e insolubles, según su magnitud molecular. La presencia de este conjunto de derivados interfiere en la valoración del radical acetilo; por ello se hace necesaria la separación de éstos acompañantes del acetohidroxámico. Los ácidos pectohidroxámicos insolubles son fácilmente separables, en tanto que ello no ocurre con las fracciones solubles.

Un estudio del comportamiento de la acción de la hidroxilamina sobre diversas fracciones solubles e insolubles en etanol de 70 %, permitió observar que los ácidos pectohidroxámicos insolubles se generan a partir de las fracciones de pectina insolubles en alcohol. En cambio las fracciones solubles originan los ácidos pectohidroxámicos solubles; existiendo además de éstos, una proporción variable de sustancias inertes a la hidroxilaminólisis.

En el cuadro N.º 2, se transcriben dos casos típicos. En la pectina de manzana las sucesivas purificaciones eliminan las fracciones que sufren hidroxilaminólisis, y por eso los valores disminuyen. Estas fracciones eliminadas corresponden a ácidos pectohidroxámicos solubles de peso molecular pequeño. En el otro ejemplo transcripto, se produce un au-

CUADRO N.º 2

FRACCIONAMIENTO DE PECTINAS CON ETANOL DE 70 %

Pectina	Número de purificaciones	Acetilo por 100 g de pectina base seca	
		Hidroxilaminolisis directa	Destilación e hidroxilaminolisis
Citrus	0	0,076	0,050
»	3	0,065	0,050
»	5	0,057	0,052
»	7	0,055	0,054
Manzana	0	0,090	0,052
»	3	0,106	0,098
»	6	0,115	0,116

mento de los valores obtenidos; se trata de una pectina impura, en la que se elimina el material soluble y que no reacciona con la hidroxilamina.

CONCLUSIONES

Se presenta una técnica para la valoración del radical acetilo en pectinas aplicable a muestras con distinto grado de pureza. El método se basa en la liberación del radical acetilo por hidrólisis, en su conversión en acetato de etilo, en su destilación y en su transformación en ácido acetohidroxámico. Exige de 20 a 40 mg. de pectina con un contenido en 0,2 a 1 micromoles de radical acetilo que se determina en condiciones satisfactorias de especificidad.

RESUMEN

Se ha estudiado una técnica para microvaloración del grupo acetilo en pectinas de distintos orígenes y calidades. Ella es la aplicación de un nuevo método de determinación de grupos N-acetilos y O-acetilos, en compuestos orgánicos, que será el motivo de la próxima contribución de esta serie.

El método establecido se basa en la liberación del radical acetilo existente en la pectina por hidrólisis en medio alcalino, en su posterior conversión en acetato de etilo con etanol y ácido sulfúrico, y en su simultánea destilación por arrastre con aire a temperatura no mayor de 80° C. El éster destilado se recibe en solución de hidroxilamina alcalinizada donde se produce su hidroxilaminolisis. Se valora el ácido acetohidroxámico generado por fotometría del correspondiente quelato férrico. La determinación fotométrica se efectúa con fotómetro Pulfrich con filtro S 53.

El método presenta condiciones satisfactorias de especificidad, adecuado a la microvaloración el radical acetilo en pectinas. Pueden interferir los ésteres fórmicos que también destilan en las condiciones experimentales elegidas. Los resultados son reproducibles con errores por defecto del 2 al 4 % para cantidades de 0,2 a 1 micromoles de radical acetilo (10 a 50 μg), habitualmente contenidos en 20 a 40 mg de muestra. La operación es de simple ejecución y demanda unas dos horas. En ensayos comparativos entre la técnica por hidroxilaminólisis directa y la que se propone, los resultados son coincidentes solamente con muestras de pectinas insolubles o purificadas con alcohol de 70 %; en cambio los valores interfieren para las que contienen pectinas solubles o impurezas que interfieren en la coloración final. En este último caso el método propuesto resulta más conveniente.

SUMMARY

A microtechnique for the quantitative determination of acetyl groups in different kinds of pectins is given. The technique is an application of a new method for determination of O-acetyl and N-acetyl groups in organic compounds, which will be our next paper of this serial. The technique is based on the liberation of the acetyl group from the pectin in alkaline medium, in its further conversion in ethyl acetate with ethanol and sulfuric acid, and in its simultaneous distillation by suction with air at no more than 80° C. The distilled ester is received in alkaline hydroxylamine for its conversion in acetohydroxamic acid, and finally photometrically estimated as iron III quelate. The proposed method presents acceptable conditions of specificity for the adequate determination of microamounts of acetyl groups in pectins. The results agrees with the direct hydroxylaminolysis methods only with insoluble or purified in 70 % ethanol pectins, and disagrees when they contains soluble pectins or impurities which interferes in the final colour.

BIBLIOGRAFIA

- EHRlich F. y VON SOMMERFELD R., *Biochem. Z.*, 168, 3 (1926).
GUAGNINI O. A. y VONESCH E. E., *MIKROCHIM. Acta*, 372, (1959); *Anal. Asoc. Quim. Arg.*, 47, 41 (1959).
HENGLEIN F. A. y VOMMERT B., *Macromol. Chem.*, 2, 77 (1948).
JERMYN M. A. y TOMKINS R. G., *Biochem. J.*, 47, 437 (1950).
McCOMB E. A. y McCREADY R. M., *Anal. Chem.*, 29, 819 (1957).
McCREADY R. M. y McCOMB E. A., *Food Research.*, 19, 530 (1954).
McCREADY R. M. y REEVE R. M., *Agr. Food Chem.*, 3, 260 (1955).
MYERS P. B. y BAKER C. L., *Bulletin N.º 187. Technical N.º 15, University of Delaware Agricultural Experimental Station. U. S. A.* (1955).
PEACH M. y TRACEY M. V., *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Tomo II*, pág. 250. Springer Verlag. Berlín (1955).
NELSON E. K., *J. Amer. Chem. Soc.*, 48, 2945 (1926).
PIPPEN E. L., McCREADY R. M. y OWENS H. S., *Anal. Chem.*, 22, 1457 (1950).
PIPPEN E. L., McCREADY R. M., y OWENS H. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 813 (1950).