

Tesis de Posgrado

Determinación e identificación de Nipagin en productos alimenticios

Komac, Juan

1955

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Komac, Juan. (1955). Determinación e identificación de Nipagin en productos alimenticios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0860_Komac.pdf

Cita tipo Chicago:

Komac, Juan. "Determinación e identificación de Nipagin en productos alimenticios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1955. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0860_Komac.pdf

MINISTERIO DE EDUCACION
UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

" DETERMINACION E IDENTIFICACION DEL NIPACIN EN
PRODUCTOS ALIMENTICIOS "

TESIS: 860

Tesis presentada para optar al
título de Doctor en Química
por
JUAN KOEHLER

MINISTERIO DE EDUCACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

" DETERMINACION E IDENTIFICACION DEL NIPAGIN EN
PRODUCTOS ALIMENTICIOS "

Res de Tesis: 860

Resumen de la Tesis presentada
para optar al título de
Doctor en Química
por

JUAN KOMAC

F O R M A
RESUMEN DE LA TESIS

" DETERMINACION E IDENTIFICACION DEL NIPAGIN EN
PRODUCTOS ALIMENTICIOS "

Presentada para optar al título de Doctor en Química por

JUAN KOMAC

- Año 1955 -

A.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

- I.- Se hace una reseña sobre la definición, clasificación, condiciones que deben reunir y forma de actuar de los conservadores en productos alimenticios, refiriéndose especialmente al nipagin, que es el éster metílico del ácido p. hidroxibenzoico, y otros ésteres del ácido p. hidroxibenzoico que también se usan como conservadores de alimentos.-
- II.- Se consignan las características, el uso, solubilidad y otras constantes físicas y propiedades químicas del nipagin y del ácido p. hidroxibenzoico.-
- III.- Se describen las técnicas de las siguientes reacciones cualitativas usadas para la investigación del nipagin y del ácido p. hidroxibenzoico :
- a) Reacción de Millón : se obtiene un color rojo con reactivo de Millón.
 - b) Reacción con Cl_3Fe : se obtiene un precipitado amarillo amorfo.
 - c) Reacción con Cl_2Hg y NO_2Na : se obtiene color rojo que pasa al éter .
 - d) Precipitación de la sal de cobre del ácido p. hidroxibenzoico : Se precipita la sal de amonio del ácido p. hidroxibenzoico con $SO_4Cu. 5H_2O$ obteniéndose cristales característicos que se observan al microscopio.-

FENOL

- e) Diferenciación del nipagin de otros ésteres del ácido p. hidroxibenzoico por identificación de los alcoholes combinados.
- f) Métodos de separación del ácido p. hidroxibenzoico del ácido benzoico y sus derivados :
 - 1) Per destilación con arrastre con vapor de agua : no destila el ácido p. hidroxibenzoico.
 - 2) Por extracción con Cl_4C : se mantiene insoluble al ácido p. hidroxibenzoico.
 - 3) Por precipitación con $SO_4Cu. 5 H_2O$: precipita el ácido p. hidroxibenzoico.

IV.- Se describen los siguientes métodos cuantitativos empleados para la valoración del nipagin :

- a) Técnica de Weiss : es una extracción con éter del ácido p. hidroxibenzoico liberado del nipagin, evaporación del éter y determinación del peso del residuo etéreo.
- b) Hidrólisis del nipagin, destilación del alcohol metílico producido y su titulación por iodometría.
- c) Valoración del alcohol metílico obtenido por hidrólisis del nipagin, por colorimetría empleando el reactivo de Schiff.-

V.- Se describe el método de valoración propuesto que consiste en :

- a) Saponificación de la sustancia en estudio, a la que se ha adicionado nipagin.-
- b) Acidificación y extracción con éter del ácido p. hidroxibenzoico.
- c) Evaporación del éter sobre solución de CO_3Na_2 al 10 %.
- d) Llevar a volumen y valoración de la función fenólica del ácido p. hidroxibenzoico con reactivo Folin-Ciocalteu empleando espectrofotómetro

en banda de 600 milimicrones.

f) Preparación de la curva tipo para el ácido p. hidroxibenzoico.

B.- PARTE EXPERIMENTAL

I.- Se preparan muestras de tres alimentos distintos a los que se adiciona nipagin.-

Se eligen los siguientes alimentos:

Vino tinte

Carne en conserva

Sardinas en lata

a los que se adiciona nipagin en la proporción de 1 o/oo.

II.- Se ensayan las siguientes reacciones cualitativas sobre las muestras preparadas :

a) Reacción de Millón

b) Reacción con Cl_3Fe

c) Reacción con Cl_2Hg y NO_2Na

d) Precipitación del ácido p. hidroxibenzoico con $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

Se obtienen resultados positivos en todos los casos.

III.- Se prepara una curva tipo para el ácido p. hidroxibenzoico usando soluciones de nipagin, empleando concentraciones en que la sensibilidad del espectrofotómetro es óptima, con la técnica descripta para el método de valoración propuesta.-

Se traza la curva de % de transmisión de luz en función de concentración del nipagin en las soluciones.-

DOFNA

- IV.- Se valora el nipagin en las muestras de alimentos preparadas, empleando el método de valoración propuesto y la curva tipo para el ácido p-hidroxibenzoico.-
- V.- Se llega a la conclusión de que tanto las reacciones cualitativas ensayadas, como el método de valoración propuesto son aplicables para la identificación y valoración del nipagin en los tres alimentos en que se han estudiado.-

Julio L. Quintanilla

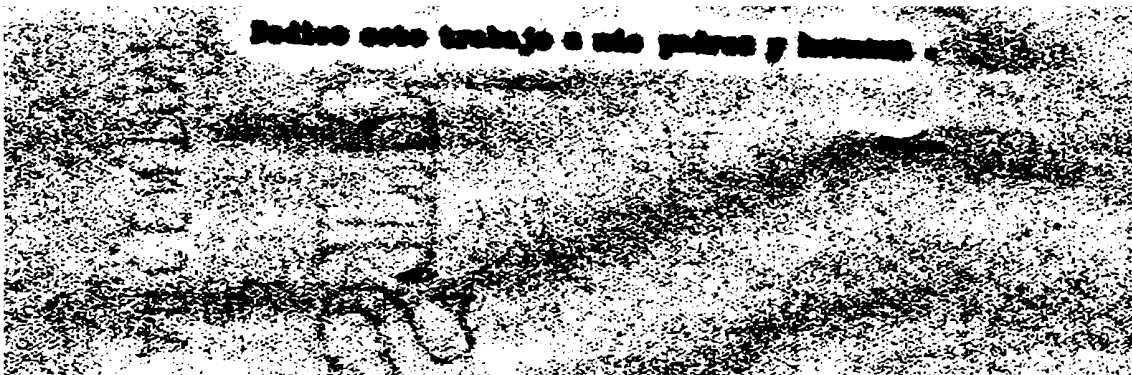
Juan Komac
Juan Komac

101111

Padrão de Tintas :

Professor Adjunto Dr. Adolfo Leandro Santos

Realice este trabajo a sus padres y hermanos.



AGRADECIMIENTO

Al Dr. Adolfo L. Natus, Profesor Adjunto de la Cátedra de
Ergonomía y Análisis Industriales de la Escuela de Químicas,
quien, con su asesoramiento y ayuda hizo posible la realización
de este trabajo.

DETERMINACION E IDENTIFICACION DEL NIPAGIN EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS

El trabajo se divide en :

A.- Antecedentes Bibliográficos

- I.-** Usos del nipagin y otros ésteros del ácido p-hidroxibenzoico como conservadores en alimentos.
- II.-** Características del Nipagin y métodos para su investigación y valoración.
- III.-** Método de valoración propuesto.

B.- Parte Experimental

- I.-** Preparación de muestras a las que se incorpora nipagin y ajuste del método adecuado para su extracción.
- II.-** Aplicación de las técnicas indicadas en la bibliografía.
- III.-** Aplicación del método de valoración propuesto.
- IV.-** Resumen y conclusiones.

A.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1.- Usos del hipoclorito y otros ésteres del ácido p-hidroxibenzoico como conservadores de alimentos.

Conservadores

El uso de conservadores en alimentos es una vieja práctica y el empleo de muchos productos como la sal, el ahumado de carnes, etc., es conocido desde hace mucho tiempo, pero sólo en los últimos 30 años el uso de conservadores químicos sintéticos tomó incremento.

Los conservadores químicos tienen la ventaja de continuar su efecto conservador cuando el alimento es expuesto al aire a la temperatura ordinaria; es un proceso más económico que la aplicación del frío y del calor.

Los alimentos preservados con conservadores químicos, se conservan sólo por un tiempo limitado, ya que éstos solamente retardan la descomposición de los alimentos y no la evitan.

Condiciones que debe reunir un conservador adecuado

- 1) En cantidades razonables no debe dañar la salud del consumidor.
- 2) No debe ser usado para hacer posible la comercialización de productos de inferior calidad.
- 3) Su uso no debe hacer posible el empleo de métodos descuidados e imperfectos de manufactura de los alimentos.
- 4) No debe ser irritante.
- 5) Debe ser eficiente en su acción.
- 6) No debe retardar la acción de las enzimas digestivas.

- 7) No debe tener tendencia a descomponerse en el cuerpo en sustancias que tengan mayor poder tóxico que el mismo.-
- 8) Debe ser posible determinarlo por métodos sencillos para simplificar el control (1).-

Definición y forma de actuar de los conservadores químicos

Los conservadores se definen generalmente como sustancias que tienen propiedades antisépticas en las condiciones de su uso, es decir, que son sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos via que necesariamente tengan que destruirlos.-

La inhibición efectiva del crecimiento de las bacterias, preserva la descomposición de los alimentos.-

Esta definición es limitada pues la descomposición de los alimentos puede producirse sin tener relación con el crecimiento de los microorganismos. Estas descomposiciones son atribuidas a una oxidación o a la acción de enzimas autóliticas.-

Hay sustancias que evitan estas acciones y que se consideran como conservadores

El mecanismo de la forma de actuar de los conservadores no fué todavía enteramente dilucidado, pero es posible que los conservadores prolonguen la fase del crecimiento bacterial.-

También puede aplicarse como una interferencia en las reacciones de cadena que producen la descomposición.-

Se puede definir más generalmente a los conservadores como sustancias que sirven para retardar, impedir o disimular los cambios indeseables en los alimentos.-

Muchas de las sustancias que se usan como conservadores pueden ser inercias o relativamente inercias, por ejemplos el azúcar, la sal, vinagre, alcohol, el ahumado, etc., pero no pueden ser considerados ordinariamente como conservadores químicos, y hay autores que los consideran como conservadores con propiedades de condimentos, en

aplicada a los conservadores químicos, como el benzoato de sodio, ácido salicílico, ácido láctico, formal, etc.-

De acuerdo a estos conceptos, el Acta Británica de Alimentos y Drogas de 1928 lo define así:

Conservador significa toda sustancia que es capaz de inhibir, retardar o detener los procesos de fermentación, acidificación u otras descomposiciones en alimentos o para disimular las evidencias de ese proceso, pero no debe incluirse la sal común, nitrato de sodio o potasio, azúcar, ácido acético o vinagre, alcohol o aguardientes comestibles, especias, aceites esenciales u otras sustancias añadidas a los alimentos en el proceso de cura llamado curado.-

Las razones de la prohibición, declaración y limitación en el uso de los conservadores son las siguientes :

- 1) Pasándose de los límites máximos pueden ser peligrosos por los efectos acumulativos.-
- 2) Pueden ser usados para encubrir daños e inferioridades en los alimentos.-
- 3) Podrían ser usados sin el conocimiento del consumidor (2).-

Clasificación de los conservadores

- 4) Antioxidantes
- 5) Neutralizadores
- 6) Agentes de cubierta
- 7) Estabilizadores
- 8) Emulsificadores

etc. (3)

Uso del nigacin y otros ésteres del ácido para hidroxibenzoico

El uso del nigacin y otros ésteres del ácido p. hidroxibenzoico en productos farmacéuticos, de cosmética y preparadas técnicas, está bastante generalizado y en empleo en la preservación de alimentos así en suero.

El metil, etil y propil éster del ácido para hidroxibenzoico son probablemente los conservadores más usados en Alemania, donde fué aprobado el uso de los ésteres propílico y etílico, así como sus compuestos aditivos y mezclas

(4)-

Las reglamentaciones bromatológicas de nuestro país impiden el uso del nigagina y otros ésteres del ácido p, hidroxibenzoico en la conservación de alimentos,

de una principalmente en la conservación de conservas de pescado, conservas de carne, queso, azucenas azucaradas, vinos y otras bebidas, en una concentración que varía de 0,05 a 0,15 %

El nigagina es conocido también por los siguientes nombres :

Parubén

Metil parubén

Nalden

Solbrol

El nigagina comercial contiene aproximadamente un 25,5 % del éster del ácido p, hidroxibenzoico, 45,5 % de compuestos sulfónicos del éster y 6,5 % de p, hidroxibenzoato de sodio (S)

II.- Características del Nipagin y acciones para su investigación y valoración

Características

El nipagin es un derivado para sustituido del ácido benzoico. La introducción de grupos sustituidos en posición para aumenta la efectividad del ácido benzoico como conservador.-

El ácido benzoico y sus derivados tienen poder bacteriostático fungistático y germicida, y son más efectivos en medio ácido, así el ácido benzoico y salicílico actúan mejor cuando no están disociados, debiendo librarse de sus sales.-

La acidez del medio en que trabaja el conservador es muy importante. Un decrecimiento de pH de 7 a 3,5 aumenta entre 5 y 10 veces la acción antiséptica y bactericida (6).-

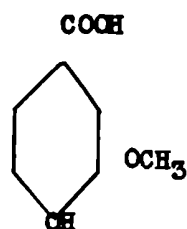
Janan y Conn (Ind. Eng. Chem) demostraron que el ácido benzoico, salicílico y anhídrido sulfúrico son casi 100 veces más eficientes en soluciones fuertemente ácidas que en soluciones neutras (7).-

En los ésteres del ácido p. hidroxibenzoico, la efectividad aumenta cuando aumenta la cadena lateral, hasta el éster butílico, luego decrece, así solamente se requiere 1/10 de n. butil p. hidroxibenzoato, un conservador usado en cosméticos, de lo que se usaría de ácido salicílico o benzoico para producir el mismo efecto.-

Los ésteres del ácido vainílico pueden considerarse como metoxi derivados del ácido p. hidroxibenzoico.-



ácido p. hidroxibenzoico



ácido vainílico

Se han demostrado que los ésteres del ácido vainillado son potentes germicidas contra ciertos organismos, y también, como en el caso de los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico su acción conservadora aumenta con la cadena lateral hasta el éster metílico y luego decrece.

Parecen ser efectivos contra los hongos y especialmente contra las bacterias que forman esporas resistentes al calor.

El vainillato de etilo tiene la misma dosis tóxica que el benzoato de sodio cuando es administrado en aceite de oliva a ratas y ratones, pero el vainillato es menos tóxico que el benzoato en soluciones acuosas.

De acuerdo a Pearl, el vainillato de etilo en cantidades de hasta 0,1 % podría ser aceptado para la conservación de alimentos (8).

Los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico son fácilmente solubles en alcohol, éter, monóxido de petróleo y cloroformo, relativamente difícilmente solubles en agua caliente y se disuelven más difícilmente en agua fría.

Constantes físicas :

Éster metílico	p.f.	151	°C
Éster etílico	p.f.	116	°C
Éster propílico	p.f.	96,8	°C (9)

El éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico sublima alrededor de los 70°C obteniéndose cristales metastables que funden a 110°C. No es arrastrable por vapor de agua.

El ácido p-hidroxibenzoico sublima a 155°C y funde entre 213 y 214°C según Jacobo-Morris y entre 208 y 210°C según otros autores.

El ácido p-hidroxibenzoico es soluble en agua caliente, alcohol y éter (10).

Métodos de Investigación

1) Reacción de Hillé

Técnica :

45 cm³. de la solución en ensayo es defecada con 5 cm³. de solución saturada de subacetato de plomo y 2 ó 3 gra. de carbón animal, se filtra. En la solución acuosa del nifagin ó ácido p. hidroxibenzoico se efectúa la siguiente reacción

Sobre 2 ó 3 cm³. de reactivo de Millón en un tubo de ensayo se vierte 2 cm³. de la solución acuosa del ácido p. hidroxibenzoico, de modo que no se mezclen, se deja en reposo una hora.

Si existe en la muestra por lo menos 0,5 g. c/c de nifagin se observa un anillo de color rojizo en el plano de separación de ambos líquidos. Si existe mayor cantidad puede dar coloración roja aún cuando se agite y mezclen los líquidos.

Debe tratar de diluirse lo menos posible al reactivo de Millón.

La reacción es ayudada por un calor de 60°C - 70°C sobre baño María, pero cuidando de no llegar a los 80°C por cuanto a dicha temperatura la emulsión formada (a la que se debe la coloración roja), es destruida y la reacción no se produce.

En la solución no deben hallarse presentes ni cloruro férrico ni ácido clorhídrico que actúan adversamente en la reacción (11).

2) Reacción con cloruro férrico

Técnica :

a una solución conteniendo ácido para hidroxibenzoico se le agrega una solución de Cl₃Fe al 0,5 %

Se produce un precipitado amarillo anarfo.

Previamente debe neutralizarse la solución de Cl₃Fe con amoníaco diluido, hasta formarse un ligero precipitado y luego filtrar (12).

3) Reacción con cloruro mercurico y nitrito de sodio.

Técnica :

La sustancia en ensayo que contiene nupagin se acidifica y extrae con éter siguiendo las técnicas habituales. Se evapora el éter y el residuo etéreo se disuelve en agua caliente.

2 cm³ de esta disolución calentar a baño María durante 15 a 20 minutos con 2 cm³ del reactivo : se produce un color rojo que pasa al éter.

Sensibilidad de la reacción : 0, 0015 g de éter.

El reactivo se prepara con 22 gra. de H₂O₂ y 1,25 gra. de Cl₂g disueltos en 30 cm³ de agua. Se filtra (13).

4) Precipitación del ácido p. hidroxibenzoico como sal de cobre (Wain)

Técnica :

Disolver el ácido p. hidroxibenzoico en exceso de amoníaco, calentar a baño María hasta no percibir olor a amoníaco. Agregar SO₄Cu. 5 H₂O en polvo fino.

Se obtiene un precipitado formado por cristales característicos en forma de agujas de color azul claro que se identifican por observación microscópica (14).

5) Separación del ácido p. hidroxibenzoico del ácido benzoico y otros derivados del ácido benzoico

Se puede separar el ácido p. hidroxibenzoico del ácido benzoico y de otros derivados del ácido benzoico por los siguientes métodos:

a) Mediante la precipitación del ácido p. hidroxibenzoico con SO₄Cu. 5 H₂O.

b) Por extracción con Cl₂ : el ácido p. hidroxibenzoico es poco soluble. Son fácilmente solubles :

ácido benzoico

ácido salicílico

ácido o. clorobenzoico

Ácido p. clorobenzoico

Ácido v. anílico

e) Por destilación con arrastre de vapor de agua permite la separación del ácido p. hidroxibenzoico, que no destila, de los ácidos benzoico y salicílico, que destilan (15).-

6) Diferenciación del nítrio de otras ésteres del ácido p. hidroxibenzoico, por la nitrificación de los alcoholes combinados al ácido p. hidroxibenzoico.

Técnica :

La sustancia en estudio se extrae con éter-éter sulfúrico 1:1 en medio débilmente sulfúrico, incorporando luego el éter a temperatura mayor de 40°C.

El residuo etéreo se hidroliza con 5 cc. de HCl al 2 % se destila 3 cm³.

Sobre la fracción que no destiló se efectúan las reacciones del ácido p. hidroxibenzoico ya descritas.-

El alcohol anílico destilado se oxida a formaldehído con KMnO_4 y se detecta con reactivo de Schiff.

Reactivo de Schiff :

Disolver 0,5 g. de fucsina pura en 400 cm³. de agua caliente, enfriar agregar 2 grs. de bisulfito de sodio anhidro, disolviéndolo, agregar 4 cm³. de ácido sulfúrico concentrado. Transferir a un envase opaco.-

Tomar 0,5 cm³. de destilado en un tubo y diluir con 4,5 cm³. de agua. Agregar 2 cm³. de solución fresca conteniendo 3 grs. de $\text{Na}_2\text{O}_4\text{K}$ y 15 cm³. de PO_4H_3 en 100 cm³. de solución.-

Agitar y dejar la mezcla en reposo durante 10 minutos.-

Agregar 2 cm³. de una solución conteniendo 5 grs. de ácido anílico disuelto en 100 cm³. de una solución de ácido sulfúrico concentrado y agua en partes iguales y enfriado.-

Cuando la solución se ha decolorado agregar 5 cm³. de reactivo de Schiff y mezclar bien.-

Dejar en reposo durante 10 minutos.

La presencia del alcohol metílico se reconoce por el color azul o violeta que produce el metanal obtenido por la oxidación del alcohol metílico con el permanganato de potasio.-

Otros alcohidos no interfieren pues el ácido inhibe la formación de color.-

Este método puede hacerse cuantitativo por comparación con tipos en un colorímetro (16).-

Alcoholes etílico y propílico :

Se saponifica la sustancia en estudio con 2 cm³. de KOH al 10 % durante 1 hora a baño María, destilar 4 cm³. enfriando con agua fría el colector.-

2 cm³. del destilado oxidar con Cr₂O₇H₂ al 20 % . Se identifica el ácido acético obtenido por la oxidación del alcohol etílico porque forma cristales característicos al agregar m. y p. nitrofenilhidrazina.-

La ácido propiónico no da cristales tan característicos.- (17)

Método de valoración

1) Técnica de Weiss : La solución en ensayo se extrae con éter, el residuo se saponifica, la solución alcalina se acidifica y extrae con éter.-

Se evaporar el éter proveniente de las dos extracciones y el residuo étereo se pesa, obteniéndose el peso del ácido p. hidroxibenzoico.

En presencia de los ácidos benzoico, salicílico, o. y p. clorobenzoico se trata el residuo del extracto étereo con Cl₂C S se le somete a destilación por arrastre con vapor de agua, para separarlos.-

Para dosar los ésteres se saponifica las substancia en estudio, se acidifica la solución alcalina y se extrae con éter-éter de petróleo lsl. Se evapora el éter y se pesa el residuo :

metil éster : peso x 1,1
etil éster : peso x 1,2
propil éster : peso x 1,3 (18)

2) También se puede valorar el nípacina por el ensaje colorimétrico del alcohol metílico obtenido por saponificación y destilación de la substancia que contiene nípacina, con reactivo de Schiff y cuya técnica ya ha sido descrita en los ensayos cualitativos (19).-

3) Técnica de Follenberg

Se extrae con éter + éter de petróleo lsl la substancia en estudio en medio debilmente sulfúrico, se evapora el éter y el residuo etéreo se saponifica y se destila el alcohol metílico producido. El alcohol metílico destilado se titula iodométricamente. También se puede aplicar a los ésteres etílico y propílico del ácido p. hidroxibenzoico.

1 cm³. de destilado se oxida con aproximadamente 1 cm³. de Cr₂O₇K₂ 0,2 N y 4 cm³. de SO₂H₂ es realizando al mismo tiempo un ensayo en blanco.-

Después de 15 minutos verter en un Erlenmeyer lavado con 30 cm³. de agua. Enfriar, agregar 0,2 gr. de KI y titular el iodo producido con solución 0,1 N de S₂O₃Na₂.-

Restar a los cm³. gastados los que se gastaron en el ensayo en blanco.

1 cm³. de solución 0,1 N de S₂O₃Na₂ = 0,54 mg. de CH₃OH
1 " " " " " " " = 1,15 " " CH₃-CH₂OH
1 " " " " " " " = 0,60 " " CH₃-CH₂-CH₂OH

III.- Método de valoración propuesto

El método de valoración propuesto consiste en :

- a) Liberar el ácido p-hidroxibenzoico por saponificación de la muestra a la que se ha incorporado el nipagin, en una concentración conocida con NaOH 1 N a baño María durante media hora, se obtiene la sal sódica del ácido.-
 - b) Acidificar con SO_2H_2 2N para liberar el ácido p-hidroxibenzoico de su sal sódica y extraer con éter.-
 - c) Evaporar el éter sobre una solución de $\text{CO}_2 \text{Na}_2$ al 10 %
 - d) Llevar a volumen la solución alcalina.
 - e) A una parte alícuota de esta solución, agregar $\text{CO}_2 \text{Na}_2$ al 10 % y reactivo de Folin-Ciocalteu, agitar y dejar media hora en reposo.-
 - f) Efectuar las lecturas con espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 milimicrones.-
 - g) Preparación de una curva tipo para el ácido p-hidroxibenzoico empleando soluciones de nipagin de concentraciones conocidas.-
 - h) Con los valores obtenidos en la lectura en el espectrofotómetro para las muestras adicionadas de nipagin y con la ayuda de la curva tipo del ácido p-hidroxibenzoico, determinar la concentración de nipagin correspondiente en las muestras.-
- Se trata de un ensayo colorimétrico de la función fenólica del ácido p-hidroxibenzoico que en presencia del reactivo de Folin-Ciocalteu desarrolla un color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración del ácido p-hidroxibenzoico y que puede ser medida en el espectrofotómetro.-

Este método ha sido propuesto y aplicado por el Dr. Adolfo L. Montes para valorar almidón en muestras de insulina lentas en los Laboratorios Armour de la República Argentina (21).

Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu

O. Folin y V. Ciocalteu : J/A/C. 73;629 (1927)

A) Solución madre

Colocar en un balón de 1½ lt. 100 gr. de $\text{FeO}_4\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 25 gr. de $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ con 700 ml. de agua destilada.

Se disuelve y se agrega 50 ml. de FeCl_3 al 25 % y 100 ml. de HCl puro, densidad 1,19. Se conecta un refrigerante a reflujó (si la unión con el balón no es estanca, rócese el corcho o goma con papel de estano) y se hace hervir convenientemente durante 10 horas. Se agregan luego 150 gr. de SO_2 liq., 50 ml. de agua y unas gotas de bromo líquido. Se hace hervir durante 15 minutos sin refrigerante para desalojar el exceso de bromo. Se enfría, diluye hasta 1 lt. y se filtra.

El reactivo terminado no deberá tener tintos verdosos. El tinte verdoso significaría la presencia de productos azules de reducción, los que podrían falsear los resultados de la colorimetría. El reactivo debe ser protegido de polvillo atmosférico, ya que cualquier material orgánico produce gradualmente una reducción.

B) Reactivo para dosaje

Se diluye 100 ml. de la solución madre a 300 ml. con agua destilada (22).

2.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- Preparación de muestras a las que se incorpora nipagin y ajuste del método adecuado para su extracción.

Muestras :

Se preparan muestras de tres alimentos a los cuales se adiciona nipagin en una concentración de 1 g/cc.

Se elige esa concentración pues esa dentro de los límites en que se emplea habitualmente el nipagin en la conservación de alimentos.-

a) Se disuelve 2 gra. de nipagin en vino tinto llevando a 2 lt. en matras aferado.-

b) Se adiciona nipagin a muestras de sardinas en lata en una proporción de 1 gr. de nipagin por kilo de muestra, homogeneizando bien en mortero de porcelana.-

c) Se adiciona nipagin a muestras de carne en conserva en la proporción de 1 gr. de nipagin por kilo de muestra, homogeneizando bien en mortero de porcelana.-

d) Se disuelven 2 gra. de nipagin en agua destilada llevando a 2 lt. en matras aferado.-

Esta solución convenientemente diluida servirá para preparar la curva tipo del ácido p. hidroxibenzoico.-

Ajuste del método adecuado de extracción

Se intenta primeramente la extracción directa del nipagin con éter sulfúrico de la muestra a la que se acidifica con SO_3H_2 2 N para liberar el éter metílico del ácido p. hidroxibenzoico de su sal sódica.-

Inaeg de la emperación del éter sobre solución de CO_2Na_2 al 10 % y agregado del reactivo de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con la técnica que se indica más adelante, se observa que no se obtienen resultados comparativos con los obtenidos a partir de soluciones de nipagin en agua destilada, de igual concentración final que la muestra en estudio y que se usan como tipos.

Por lo tanto, se hace necesaria una hidrólisis previa de la muestra para liberar el ácido p. hidroxibenzoico de su éster metílico, con NaOH 1 N, empleando 5 cml. por cada 10 ml. de vino tinto con 1 c/ce de nipagin y 10 cml. para las muestras de sardinas en lata y carnes en conserva con 1 c/ce de nipagin, aumentándose la cantidad de NaOH 1 N en estas últimas porque tienen una cantidad apreciable de materias grasas.

Se hidroliza durante 30 minutos a baño María, con refrigerante de aire, se enfría, se acidifica con H_2SO_4 2 N y se extrae con éter etílico.

Con esta hidrólisis previa se obtienen resultados satisfactorios en la valoración colorimétrica de la función fenólica del ácido p. hidroxibenzoico con reactivo de Folin-Ciocalteu.

II.- Aplicación de las técnicas indicadas en la bibliografía

Se efectúan las siguientes reacciones cualitativas del níquel δ ácido picribenzóico, sobre las muestras de alimentos, y cuya técnica está indicada en la parte bibliográfica de este trabajo.-

1) Reacción de Millón

a) Para vino tinto :

Se defeca directamente 45 cm³. de vino tinto con solución saturada de subacetato de plomo y carbón animal, ensayando el filtrado sobre reactivo de Millón, calentando a baño María entre 60 y 70°C durante 15 minutos. Se obtiene reacción positiva.-

b) Para las muestras de carne en conserva y sardinas se extrae previamente 2 gra. de muestra con éter etílico, siguiendo la técnica indicada, se evapora el éter a baño María, y el residuo etéreo se disuelve con 4 cm³. de agua caliente, se defeca esta solución con 0,5 cm³. de solución saturada de subacetato de plomo y 0,5 gra. de carbón animal. Se filtra y el filtrado se ensaya con reactivo de Millón, obteniéndose reacción positiva después de calentar a baño María entre 60 y 70°C durante 15 minutos.-

2) Reacción del alumbre férrico

Para efectuar esta reacción se saponifica previamente las muestras de vino tinto, carne en conserva y sardinas, se acidifica y extrae con éter empleando la técnica indicada.-

Se emplea 10 cm³. de vino tinto y 2 gra. de carne en conserva y sardinas respectivamente.-

Se evapora el éter y el residuo etéreo se disuelve en 2 cm³. de agua caliente.-

Sobre estas soluciones se agrega el Cl_2Fe al 0,5 % obteniéndose reacción positiva en las tres cases.-

3) Reacción con Cl_2Hg y SO_2 Na

En esta reacción se emplea 10 cml. de vino tinto y 2 grs. de carne en conserva y sardinas.-

Las muestras se acidifican y extraen con éter siguiendo la técnica indicada. Se evapora el éter y el residuo etéreo se disuelve en 2 cml. de agua caliente. A esta solución se le agrega 2 cml. de reactivo y se calienta a baño María durante 15 minutos.-

Se obtiene reacción positiva para las tres muestras adicionadas de nifagin.-

4) Precipitación del ácido p. hidroxibenzoico como sal de cobre

Se toma 10 cml. de la muestra de vino tinto y 2 grs. de las muestras de sardina y carne en conserva, se saponifican, acidifican y extraen con éter siguiendo la técnica indicada. Se evapora el éter y el residuo etéreo se disuelve en 2 cml. de agua caliente, se le agrega amoníaco en exceso y se evapora el exceso de amoníaco a baño María. Sobre estas soluciones se agrega el SO_4Cu 5 H_2O , obteniéndose un precipitado que se observa al microscopio.-

Se reconocen en las tres cases los cristales característicos de la sal de cobre del ácido p. hidroxibenzoico.

Se determina el tamaño de los cristales :

largo : 50 a 200 micrones

espesor : 2 a 8 micrones

III.- Aplicación del método de valoración propuesta

Preparación de la curva tipo del ácido p. hidroxibenzoico

Se obtiene la curva tipo del ácido para hidroxibenzoico siguiendo la técnica propuesta.-

Técnica :

a) Se toman 20 ml. de solución de nifegín al 1 g/cc, se agrega 5 ml. de NaOH 1 N y se saponifica en un baloncito durante 30 minutos a baño María con un refrigerante de aire.-

b) Se enfría, se acidifica con SO_2H_2 2N y se extrae en una ampolla de decantación con 20 cm³. de éter etílico.-

Se decanta la fase acuosa y se le hace una segunda extracción con éter etílico. Es fundamental conducir la extracción a fondo y en forma cuantitativa.-

c) Se juntan las dos extractos etérea y se le hace un lavado con agua destilada.-

d) El extracto etéreo lavado se recibe en una cápsula de porcelana conteniendo 20 cm³. de CO_2H_2 10 % para fijar el ácido p. hidroxibenzoico como sal cálcica y se evapora el éter a baño María.-

e) Una vez evaporado el éter, se lleva la solución alcalina a 200 ml. con agua destilada en un matraz aforado, obteniéndose una solución que contiene el ácido p. hidroxibenzoico proveniente de 20 mg. de nifegín : Solución N₀.

f) Como la sensibilidad del espectrofotómetro es máxima para cantidades de nifegín comprendidas entre 0 y 0,25 mg. en 5 ml. de solución y teniendo en cuenta que la solución N₀ contiene 0,5 mg. de nifegín en forma de ácido p. hidroxibenzoico, se diluye convenientemente la solución N para obtener las siguientes concentraciones :

- 1) Seido p. hidroxibenzoico proveniente de 0,05 mg. de nifagin en 5 ml. de soluc.
- 2) " " " " 0,10 " " " " 5 " " "
- 3) " " " " 0,15 " " " " 5 " " "
- 4) " " " " 0,20 " " " " 5 " " "
- 5) " " " " 0,25 " " " " 5 " " "

g) Se toma 5 ml. de cada una de estas diluciones y se le agrega 10 ml. de CO_2H_2 al 10 % y 5 ml. de reactivo de Folin-Ciocalteu.

h) Se agita bien y se deja 30 minutos en reposo, efectuándose luego las lecturas en el espectrofotómetro a $\lambda = 600$ milmicrones.

i) El cero del aparato se determina tomando 5 ml. de agua destilada a las que se agrega 10 ml. de CO_2H_2 al 10 % y 5 ml. de reactivo de Folin-Ciocalteu, al mismo tiempo y en las mismas condiciones que en las soluciones anteriores.

Se realizan estos ensayos por duplicado obteniéndose los siguientes resultados :

I) En el primer ensayo se obtiene :

<u>tubo</u> <u>HR</u>	<u>ml. de muestra</u>	<u>ml. CO_2H_2 10 %</u>	<u>ml. reactivo</u>	<u>mg. nifagin</u>	<u>lectura %</u> <u>transmisión</u>
1)	5	10	5	0,05	69,0
2)	5	10	5	0,10	48,0
3)	5	10	5	0,15	34,0
4)	5	10	5	0,20	24,0
5)	5	10	5	0,25	17,5

A mayores concentraciones se observa desviación de la ley de Beer.

II) En el segundo ensayo se obtienen las siguientes valores :

<u>tubo</u> <u>II</u>	<u>ml. de muestra</u>	<u>ml. CO₂Na₂ 10 %</u>	<u>ml. reactivo</u>	<u>mg. nifazid</u>	<u>lectura</u> <u>transmisi.</u>
1	5	10	5	0,05	67,0
2	5	10	5	0,10	47,0
3	5	10	5	0,15	32,0
4	5	10	5	0,20	23,0
5	5	10	5	0,25	15,0

Promediando los valores obtenidos en I) y II) se obtiene :

<u>tubo</u> <u>II</u>	<u>ml. muestra</u>	<u>mg. nifazid</u>	<u>lectura %</u> <u>transmisión</u>
1	5	0,05	66,8
2	5	0,10	47,8
3	5	0,15	32,0
4	5	0,20	23,5
5	5	0,25	16,8

j) Con estos últimos valores se construye la curva tipo para el ácido p. hidroxibenzoico :

Se usa papel semilogarítmico, anotando en ordenadas (escala logarítmica) los porcentajes de transmisión y en abscisas las concentraciones de nifazid expresadas en mg. en 5 ml. de la solución.

Dosaje de nifragin en vino tinto

Técnica :

Se emplea la misma técnica indicada para la obtención de la curva tipo del ácido p. hidroxibenzoico.-

Se efectúan los ensayos sobre 10 cm³. y 15 cm³. iniciales de vino tinto con 1 g/ce de nifragin, que se saponifican, acidifican y extraen con éter, tomando la precaución de efectuar 3 lavados del extracto éter para eliminar el color.-

Después de evaporar el éter, la solución N se obtiene llevando a 500 ml. con agua destilada en ambas cases, para obtener directamente soluciones que contengan respectivamente el ácido p. hidroxibenzoico equivalente a 0,10 y 0,15 mg. de nifragin en 5 ml. de solución N.-

Se hacen los ensayos por duplicado obteniéndose los siguientes valores (para cada valor corresponden 2 lecturas en el espectrofotómetro).-

<u>tubo</u> <u>N^o</u>	<u>ml. solución N</u>	<u>ml. CO₂H₂ 10 %</u>	<u>ml. extracto</u>	<u>mg. nifragin</u>	<u>lectura</u> <u>promedio</u>
1	5	10	5	0,10	40,5
2	5	10	5	0,10	45,5
3	5	10	5	0,15	32,0
4	5	10	5	0,15	28,0

Por comparación de las lecturas efectuadas con la curva tipo del ácido p. hidroxibenzoico, corresponderían a las siguientes cantidades de nifragin en 5 cm³. de solución N :

<u>tubo</u> <u>H₁</u>	<u>ml. solución H</u>	<u>mg. nipagin</u>	<u>lectura f</u> <u>transmisión</u>	<u>mg. nipagin según</u> <u>curva tipo</u>
1	5	0,10	43,5	0,105
2	5	0,10	45,5	0,110
3	5	0,15	32,0	0,155
4	5	0,15	26,0	0,150

Qué correspondería a las siguientes concentraciones de nipagin en la muestra original que contiene 1 g/cc de nipagin

<u>tubo</u> <u>H₁</u>	<u>mg. nipagin en 5 ml. de</u> <u>solución según curva</u>	<u>concentración de nipagin</u> <u>en la muestra original</u>
1	0,105	1,05 gr. g/cc
2	0,110	1,10 gr. g/cc
3	0,155	1,05 gr. g/cc
4	0,150	1,20 gr. g/cc

Dosaje de nipagin en conservas de carne y sardinas en lata

Técnica :

Se emplea la misma técnica que se empleó en la preparación de la curva tipo para el ácido p. hidroxibenzóico y dosaje del nipagin en vino tinto.

Se usa 2 gr. de muestra de carne en conserva y sardinas con 1 g/cc de nipagin en cada caso, pero empleando 10 cc. de NaOH 1 N en la saponificación, porque estos alimentos contienen mayor cantidad de materias grasas.

Los extractos etéreo se lavan con agua destilada hasta obtenerlos suficientemente lípidos.

Para obtener la solución H se lleva a 100 ml. con agua destilada después de evaporar el éter. De esa muestra se obtienen soluciones H que contienen el ácido p. hidroxibenzóico equivalente a 0,10 mg. de nipagin en 5 ml. de solución H.

Se hace necesario filtrar las soluciones H antes de efectuar las lecturas en el espectrofotómetro porque presentan turbidez.

Los ensayos se efectúan por duplicado obteniéndose los siguientes valores :

<u>tubo</u> <u>H₂</u>	<u>muestra</u>	<u>ml. sol. H</u>	<u>ml. CO₂Na₂ 10 %</u>	<u>ml. reactivo</u>	<u>mg. nipagin</u>	<u>lectura %</u> <u>transmisión</u>
1	carne	5	10	5	0,10	47,0
2	carne	5	10	5	0,10	41,0
3	sardina	5	10	5	0,10	44,0
4	sardina	5	10	5	0,10	46,0

Por comparación de las lecturas efectuadas con la curva tipo del ácido p-hidroxibenzoico, correspondería a las siguientes cantidades de nipagin en 5 ml. de solución H₂

<u>tubo</u> <u>H₂</u>	<u>muestra</u>	<u>ml. solución H</u>	<u>mg. nipagin</u>	<u>mg. nipagin según</u> <u>curva tipo</u>
1	carne	5	0,10	0,105
2	carne	5	0,10	0,120
3	sardina	5	0,10	0,110
4	sardina	5	0,10	0,110

Que correspondería a las siguientes concentraciones de nipagin en los muestras originales que contienen 1 g/ce de nipagin :

<u>tubo</u> <u>H₂</u>	<u>muestra</u>	<u>mg. de nipagin en 5 ml. de</u> <u>sol. H según curva tipo</u>	<u>concentración de nipagin en</u> <u>la muestra original</u>
1	carne	0,105	1,05 gr. %
2	carne	0,120	1,20 gr. %
3	sardina	0,110	1,10 gr. %
4	sardina	0,110	1,10 gr. %

IV. Conclusiones

a) Las reacciones cualitativas ensayadas dan buen resultado para la identificación del níquel en vino tinto, carne en conserva y sardinas en lata.

Con excepción de la reacción de Millón sobre el vino, que puede hacerse directamente, en los demás casos debe extraerse con éter sea el éter metílico o el éter p. hidroxibenzoico, siguiendo las técnicas habituales, para separarlas de sustancias que puedan causar o interferir las reacciones.

b) El método de valoración propuesto resulta adecuado para el dosage del níquel en vino tinto, carne en conserva y sardinas en lata, obteniéndose resultados comparativos y con un error que osciló entre ± 3 y $\pm 20 \%$, no sobrepasando en general el 10% .

Adolfo L. Fuentes

Juan Komae
Juan Komae

BIBLIOGRAFIA

- (1), (2), (3), (4) Jacobs-Morris : Synthetic Food Adjuncts.
- (5) Chemical Abstracts.
- (6) Jacobs-Morris : Synthetic Food Adjuncts
- (7) Industrial Engineering Chemistry
- (8) Jacobs-Morris : Synthetic Food Adjuncts
- (9) Gibbs : Handbuch der Lebensmittelchemie
- (10) Morris E. Jacobs : The Chemical Analysis of Foods and Food Products.
- (11), (12) Ulaus Borch : Analisis y criterios de apreciación de las conservas y productos alimenticios.
- Foodson : Food Analysis
- (13) Gibbs : Handbuch der Lebensmittelchemie
- Hermann Schmitt-Hobbelt: Tratado de Bromatología.
- (14) Gibbs : Handbuch der Lebensmittelchemie
- Morris E. Jacobs : The Chemical Analysis of Foods and Food Products.
- (15) Gibbs : Handbuch der Lebensmittelchemie.
- (16) Morris E. Jacobs: The Chemical Analysis of Foods and Food Products.
- (17), (18) Gibbs : Handbuch der Lebensmittelchemie
- (19) Morris E. Jacobs : The Chemical Analysis of Foods and Food Products.
- (20) Gibbs : Handbuch der Lebensmittelchemie.
- (21) Santos A. L. : Nota al Director Científico de Laboratorios Armour de la República Argentina (4/5/55).
- (22) Journal of Biological Chemistry.

LIBRO I

I.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I.- Uso del nipagin y otros éteres del ácido p. hidroxibenzoico como conservadores de alimentos.

Conservadores

Condiciones que debe reunir un conservador adecuado

Definición y forma de actuar de los conservadores químicos

Clasificación de los conservadores

Uso del nipagin y otros éteres del ácido p. hidroxibenzoico

II.- Características del nipagin y métodos para su investigación y valoración.

Características

Métodos de Investigación :

- 1) Reacción de Millón
- 2) Reacción con cloruro férrico
- 3) Reacción con cloruro mercurico y nitrito de sodio
- 4) Precipitación del ácido p. hidroxibenzoico como sal de cobre (Weiss).
- 5) Separación del ácido p. hidroxibenzoico del ácido benzoico y otros derivados del ácido benzoico
- 6) Diferenciación del nipagin de otros éteres del ácido p. hidroxibenzoico, por identificación de los alcoholes combinados al ácido p. hidroxibenzoico

Métodos de valoración :

Técnica de Weiss

Técnica de Pollenberg

III.- Método de valoración propuesta

Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu

II.- PARTE EXPERIMENTAL

I.- Preparación de muestras a las que se incorpora nipagin y ajuste del método adecuado para su investigación

Muestras

Ajuste del método adecuado de extracción

II.- Aplicación de las técnicas indicadas en la bibliografía :

- 1) Reacción de Millón
- 2) Reacción de cloruro férrico
- 3) Reacción con Cl_2Hg y KO_2Na
- 4) Precipitación del ácido p. hidroxibenzoico como sal de cobre.

CONTENIDO

Página II

<u>Aplicación del método de valoración propuesta</u>	20
<u>Preparación de la curva tipo del ácido p-hipocresónico</u>	20
<u>Dosaje de nifogin en vino tinto</u>	23
<u>Dosaje de nifogin en conservas de carnes y sardinas en lata</u>	24
<u>Conclusiones</u>	26
<u>Bibliografía</u>	27