

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA Y ANALISIS
QUIMICO APLICADO

Prof. Dr. D. RAFAEL GARCÍA VILLANOVA

ESTUDIO DE LA OXIDACION PERIÓDICA DE LA ACETOINA
Y POSIBILIDAD DE SU DETERMINACION ESPECTROFOTO-
METRICA MEDIANTE LA FORMACION DE ACETALDEHIDO-
SEMICARBAZONA

M.^a D. RUIZ LÓPEZ, M.^a R. F. OLEA Y R. GARCÍA-VILLANOVA

RESUMEN

Se ha realizado un estudio espectrofotométrico de la reacción de la acetoina y semicarbacida, previa oxidación de ésta a acetaldehído para dar acetaldehído-semicarbazona. La ley de Beer se cumple para concentraciones de acetoina comprendidas entre $4,4 \cdot 10^{-2}$ y $2,6 \cdot 10^{-1}$ mg. Se ha determinado el coeficiente de extinción de acetaldehído-semicarbazona y el valor encontrado resulta ser: $E_{223} = 10.133 \text{ M}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$. Se confirma la posibilidad de determinación de acetoina por el método espectrofotométrico ensayado.

SUMMARY

A spectrophotometric study of the reaction of acetoin and semicarbacide, previous oxidation of acetoin to acetaldehyde to give acetaldehyde-semicarbazone has been realized. Beer's law is obeyed for the range $4,4 \cdot 10^{-2}$ - $2,6 \cdot 10^{-1}$ mg of acetoin. The extinction coefficient of acetaldehyde-semicarbazone has been determined and the value found is $E_{223} = 10.133 \text{ M}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$. The possibility of determination of acetoin by this spectrophotometric method has been confirmed.

RESUME

On étudie par spectrophotometrie la reaction de l'acetoine avec la semicarbazide préalable l'oxidation á acetaldehyde pour obtenir acetaldehyde-semicarbazone. La loy de Beer est suivie por concentracions de acetoin comprises entre $4,4 \cdot 10^{-2}$ et $2,6 \cdot 10^{-1}$ mg. On a déterminé le coefficient d'ex-

tion de la acetaldehyde-semicarbazone, et la valeur trouvée est $E_{223} = 10.133 M^{-1} 1 \text{ cm}^{-1}$. On a constaté la possibilité de détermination de l'acétoïne par cette méthode spectrophotométrique.

INTRODUCCION

La acetoina junto con el diacetilo, producto de oxidación de la primera, influye en los caracteres organolépticos de numerosos productos que se someten a procesos de fermentación o maduración, tales como queso, mantequilla, vinagre, etc.

Se han identificado las bacterias lácticas capaces de elaborar cantidades importantes de acetoina y diacetilo. Se trata del *Leucocostoc citrovorum* y *L. paracitrovorum*. Para activar la formación de sustancias aromáticas hay que cultivarlas en medio ácido y desarrollarse en asociación con bacterias muy acidificantes como son los *Streptococos lacti* y *S. cremoris*.

Se ha aclarado el papel desempeñado por el ácido cítrico presente en la nata. Gracias a este ácido, las bacterias elaboran acetoina, diacetilo y butilenglicol según un mecanismo estudiado por DE MAM y PETTE, en la que participan como intermediarios los ácidos pirúvicos, oxalacético y acetoláctico.

Se han propuesto numerosos métodos para la determinación de la acetoina, basándose en diferentes técnicas, así la oxidación hasta diacetilo con Cl_3Fe y su posterior determinación gravimétrica mediante la formación de dimetilglioximato de níquel propuesto por LECOK (1). Se determina asimismo por reacción con la creatina y el alcohol isopropílico por análisis espectrofotométrico, previa oxidación a diacetilo, técnica utilizada por MATTIONI (2).

La cromatografía ha sido empleada por diversos investigadores, de este modo SKIBINA (3) hace una investigación conjunta de acetoina diacetilo y 2-3 butilenglicol.

MALAPRADE (4) introduce el IO_4H como reactivo de oxidación de los glicoles. GUERNET y col. (5) han estudiado la oxidación de la lactulosa con IO_4H y MALANGEAU (6) hace un estudio comparativo de la oxidación de cetoheptosas con pentóxido de vanadio y con IO_4H .

El IO_4H tiene gran importancia en el análisis orgánico al ser selectivo frente a ciertos grupos funcionales. Es aplicable a los

compuestos que tienen dos grupos hidroxilos, un grupo hidroxilo y un grupo ceto o un grupo hidroxilo y un grupo amino, en átomos de carbono adyacentes.

Se ha realizado por nosotros (7), con anterioridad un estudio espectrofotométrico de la reacción de acetaldehído con el clorhidrato de semicarbacida, cuya finalidad era la determinación de acetaldehído en alimentos, mediante la formación de acetaldehído-semicarbazona. Este producto presenta un máximo de absorción a 223 nm y la absortividad molar tiene un valor de $10.133 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Espectrofotómetro U. V., Hitachi Perkin Elmer, mod. 14 y registro gráfico mod. 165.

Potenciómetro-radiometer, pH-meter-26.

Material de vidrio habitual.

Reactivos

Acetoina, marca Merk (R. A.).

ClH-semicarbacida marca Merk (R. A.).

Peryodato potásico marca F. E. R. O. S. A. (R. A.).

Los demás reactivos empleados son de pureza analítica.

Disoluciones empleadas

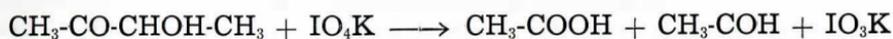
- Disolución de semicarbacida 10^{-2}M .—0,1115 g de semicarbacida disueltos en agua destilada hasta 100 ml.
- Disolución reguladora de $\text{PO}_4\text{H}_3/\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.—13,6 g de fosfato monopotásico y 0,311 g de ácido fosfórico y se llevan a un volumen final de 100 ml con agua destilada.
- Disolución de peryodato potásico 10^{-2}M .—2,30 g de IO_4K se disuelv
- Disolución de tiosulfato sódico.—Se disuelven en agua destilada hasta 1.000 ml, 2,48 g de tiosulfato sódico.

— Disolución de Ioduro potásico al 15 %.—15 g de IK se disuelven en agua destilada hasta 100 ml.

— Disolución de acetoina $10^{-3}M$.—0,088 g de acetoina se disuelven en agua destilada hasta 1.000 ml.

Estudio de la concentración óptima de IO_4K para la oxidación de acetoina

La acetoina en la oxidación con IO_4K se transforma cuantitativamente en ácido acético y acetaldehído de acuerdo con el siguiente esquema:



Se han realizado experiencias con 0,5 ml de disolución de acetoina $10^{-3}M$ y el acetaldehído resultante de la oxidación peryódica, se ha condensado en b. m. hirviendo con 5 ml de disoluciones de ClH-semicarbácida $10^{-2}M$. Una vez fría la disolución, se agrega 1 ml de disolución reguladora de fosfato, para fijar el pH = 3,5.

Las lecturas espectrofotométricas se han practicado a 223 nm frente a un blanco de disolución reguladora diluida de fosfato monopotásico.

En la tabla siguiente se hacen constar los valores medios de la absorbancia de cinco experiencias concordantes.

TABLA I

<i>ml</i> <i>IO_4K $10^{-2}M$</i>	<i>Absorbancia</i> <i>223 nm</i>
5	0,20
10	0,30
15	0,10
20	0,10
25	0,01

Influencia del tiempo

Se realizaron experiencias paralelas empleando 5 y 10 ml de disolución de IO_4K 10^{-2} M y 0,5 ml de acetoina 10^{-3} M. Aumentando el tiempo desde 5 a 180 min. Se realizó la técnica ya descrita y los resultados se observan en la gráfica de la figura 1.

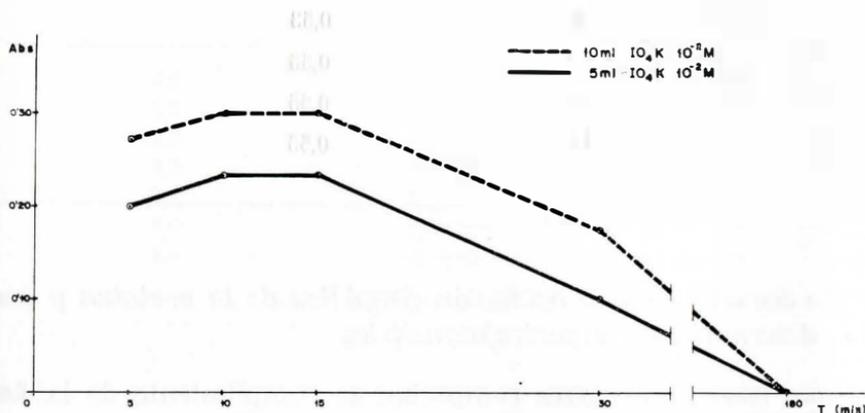


FIGURA 1

Interferencias de mínimas cantidades de IO_4K y IO_3K en la determinación espectrofotométrica de acetaldehído-semicarbazona

El IO_3K e IO_4K presentan una banda de absorción a 228 nm. Con el fin de eliminar la posible interferencia, ya que el acetaldehído-semicarbazona tiene un espectro de absorción con un máximo a 223 nm, se hace necesaria la reducción del peryodato y yodato con IK y tiosulfato sódico.

Volumen óptimo recogido de la destilación

El acetaldehído procedente de la oxidación, se recoge mediante destilación sobre 5 ml de clorhidrato de semicarbacida 10^{-2} M. Se han recogido diferentes volúmenes de destilado y se observa que a partir de 10 ml los valores de absorbancia permanecen constante. Los resultados encontrados están indicados en la tabla II.

TABLA II

<i>Volumen recogido del destilado ml</i>	<i>Absorbancia a 223 nm</i>
5	0,44
7	0,53
10	0,55
12	0,55
15	0,55

Método seguido para la oxidación peryódica de la acetoina y posterior determinación espectrofotométrica

Como paso previo para comprobar el cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer, se ha seguido la siguiente técnica. A un volumen de disolución de acetoina 10^{-3} M, se le agrega 10 ml de disolución de IO_4K 10^{-2} M y transcurridos 15 min., tiempo óptimo de oxidación, se adiciona 10 ml de IK al 15 % y 10 ml de disolución de tiosulfato sódico 10^{-2} M.

El conjunto se destila hasta recoger 10 ml sobre 5 ml de clorhidrato de semicarbacida 10^{-2} M.

El destilado se mantiene a reflujo en b. m. durante 30 min., se deja enfriar y se añade 1 ml de disolución reguladora de fosfato para mantener el pH a 3,5. Se transvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 25 ml y se completa el volumen hasta el enrase. Se mide la absorbancia de la disolución a 223 nm frente a un blanco de disolución diluida de fosfato.

Cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer

La comprobación de la Ley de Lambert-Beer se ha efectuado siguiendo la técnica anteriormente descrita.

Se han tomado cantidades crecientes de la disolución de acetoina 10^{-3} M. En la gráfica de la figura 2 se consignan los valores de absorbancia frente a la concentración de acetoina empleada, los cuales se exponen en la tabla III.

TABLA III

<i>Acetoina</i> 10^{-3} M <i>ml</i>	<i>Acetoina</i> <i>mg</i>	<i>Absorbancia a</i> <i>223 nm</i>
0,5	$8,8 \cdot 10^{-2}$	0,28
1,0	$4,4 \cdot 10^{-2}$	0,50
1,5	$1,32 \cdot 10^{-1}$	0,66
2,0	$1,76 \cdot 10^{-1}$	0,88
2,5	$2,20 \cdot 10^{-1}$	1,08
3,0	$2,64 \cdot 10^{-1}$	1,28
3,5	$3,10 \cdot 10^{-1}$	1,28

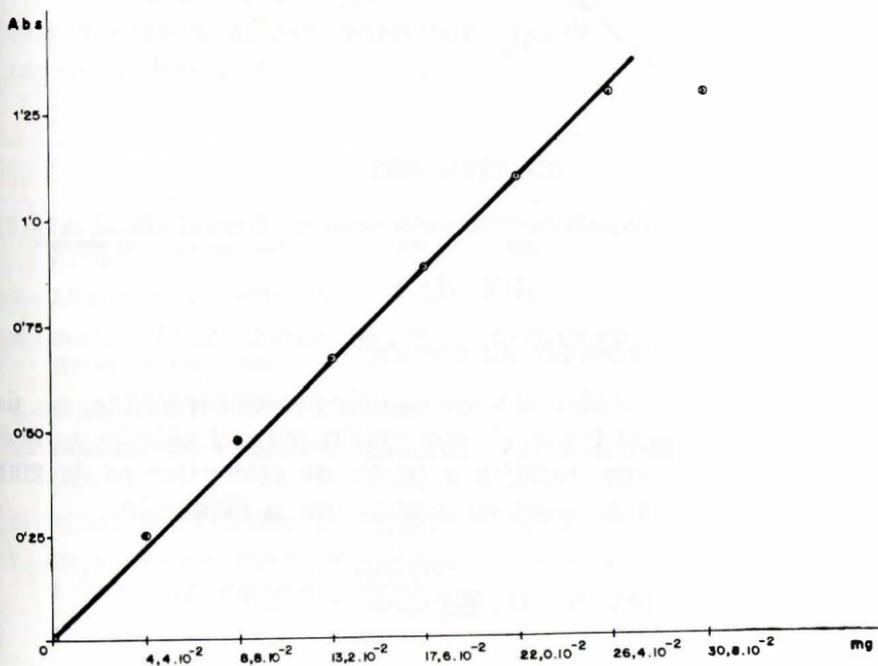


FIGURA 2

Intervalo de aplicación de la Ley de Lambert-Beer. Representación de Ringbom

Para conocer el intervalo óptimo de aplicación de la Ley de Lambert-Beer y determinar el error fotométrico mínimo se ha realizado la representación de Ringbom con los datos de la tabla III.

La gráfica de la figura 3 corresponde a la citada representación.

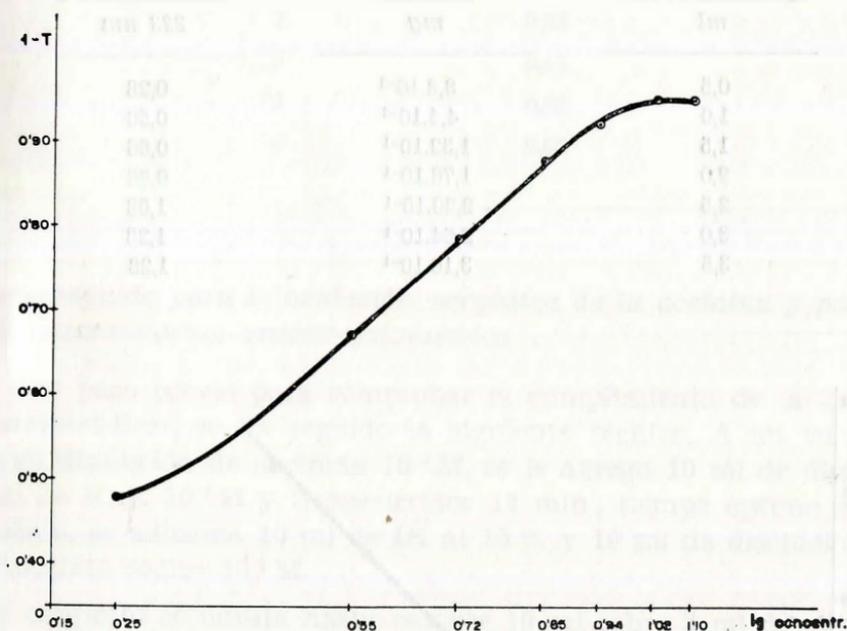


FIGURA 3

Cálculo de la concentración de acetoina

La absortividad molar del acetaldehído-semicarbazona es de $10.133 \text{ M}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ y el factor de conversión para el cálculo de acetoina presente en una muestra a partir de este valor es de 200. La concentración de acetoina se calcula por la expresión:

$$\text{Acetoina mg/Kg} = \frac{A}{P} \cdot 200$$

A = absorbancia.

P = peso de la muestra.

Discusión de los resultados

La oxidación de la acetoina a acetaldehído y acético con IO_4K es posible, siempre que la concentración de oxidante sea de 30 a 100 veces superior cuando se trabaja con una concentración de acetoina del orden de 10^{-3} M. El tiempo óptimo de oxidación para dar acetaldehído es de 15 minutos si la concentración de IO_4K en el ensayo es de 10^{-4} M.

La posible interferencia del exceso de oxidante en la medida espectrofotométrica, se evita adicionando disoluciones de IK y disolución de tiosulfato sódico.

El acetaldehído procedente de la oxidación peryódica se separa de los demás productos de oxidación cuando el volumen recogido por destilación es de unos 10 ml.

La Ley de Lambert-Beer se cumple para concentraciones acetoina comprendida entre 88

El error fotométrico mínimo se logra para valores de acetoina comprendido entre 88 μg y 220 μg .

En consecuencia, es posible la determinación de acetoina por este método a las concentraciones que se indican en la representación de Ringbom.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—LECOQ, R.: Manuel d'analyse alimentaire et d'expertises usuelles. Ed. Doin. París.
- 2.—MATTIONI, R. (1968): *Ind. Aliment.*, 7 (45), 72.
- 3.—SKIBINA, E. M.; ARTAMONOV, P. A.; GORSHKOVA, E. I. (1975): *Zh. Anal. Khim*, 30 (9), 1839.
- 4.—MALAPRADE, L. (1928): *Bull. Soc. Chim.* (4), 43.
- 5.—GUERNET, M.; CIURO, C.; MALANGEAU, P. (1965): *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (10), 47.
- 6.—MALANGEAU, P. (1969): *An. Real Acad. Farm.*, 35 (1), 37.
- 7.—OLEA SERRANO, M.^a R. F.; SÁNCHEZ, L.; GARCÍA-VILLANOVA, R.: *Ciencia & Ind. Farmacéutica* (en prensa).