

PROCEDIMIENTO COLORIMÉTRICO
PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA
Y CUANTITATIVA DEL FORMOL
EN LA LECHE

por

ABELARDO GALLEGO

Ante todo, queremos advertir a los especialistas en análisis de leches que jamás hemos hecho estudios prácticos en relación con tal especialidad y que este trabajo no tiene apenas pasado embrionario. Ha sido concebido y ejecutado casi simultáneamente. He aquí cómo:

Buscando en obras de Química y Técnica Histológica, no sabemos qué, algo relacionado con las propiedades del formol (reactivos que le caracterizan, etc., etc.), sin hallar lo que, de momento, nos interesaba, nos acudíó esta idea: utilizándose el formol para la conservación de la leche, quizá en obras de Inspección de alimentos encontremos datos que nos sean útiles.

Efectivamente, hojeando algunas de estas obras, principalmente la de nuestro compañero el Dr. Morros, profesor de la Escuela de Veterinaria de León, tuvimos ocasión de enterarnos de los diversos procedimientos utilizados por los especialistas para la determinación del formol en la leche. Pero, si bien es cierto que, en principio, todos

los procedimientos corrientemente usados nos parecieron suficientemente sensibles, no nos dejaron satisfechos en cuanto a la facilidad para ejecutarlos. Es imposible, nos dijimos, que quienes por su cargo oficial, han de hacer todos los días análisis de leche, intenten siquiera averiguar si tiene o no formol.

Entonces se nos ocurrió que, sin haber pensado en ello, habíamos descubierto, hacía tiempo, un método fácil, seguro y económico para determinar el formol en la leche. Este método era precisamente el que usábamos corrientemente en nuestros estudios de Histología: el método de coloración de los tejidos con la fucsina y el formol.

Nuestro método de coloración de los tejidos se funda en la propiedad que posee el formol de transformar en violeta el color rojo de la fucsina, convirtiéndola en un cuerpo poco o nada soluble en el agua y aun en el alcohol.

El formol es, pues, un viro fijador de las coloraciones obtenidas con la fucsina.

El método de coloración a que nos referimos se ejecuta del siguiente modo:

- 1.º Fijación de los tejidos en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Coloración con la fucsina de Ziehl diluída al 5 por 100 (agua destilada, 10 centímetros cúbicos; fucsina de Ziehl, X gotas), cinco minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Viro fijación en formol al 1 por 100 (agua destilada, 10 centímetros cúbicos; formol, II gotas), cinco minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Deshidratación en los alcoholes de 95º y absoluto.
- 8.º Aclaramiento en xilol fenicado al 5 por 100, o esencias de bergamota, orégano, etc.

Los núcleos se tiñen en violeta intenso; los protoplas-

mas, en violeta pálido; los hematíes en amarillo rojizo; etcétera, etc. (Para más detalles, véanse nuestros trabajos publicados en «Treballs de la Societat de Biologia de Barcelona»).

Es éste un método de coloración que, entre otros, posee la ventaja de poder ser ejecutado en cualquier laboratorio, por escasos que sean sus recursos, ya que no exige sino el empleo de la fucsina de Ziehl, que tanto se emplea en la coloración del bacilo de Koch, y el formol, antiséptico y fijador tan conocido y tan utilizado.

Se comprenderá bien, ahora, que, en posesión de estos datos, el problema de la determinación del formol en la leche no había de parecernos difícil. Nos bastará, nos dijimos, agregar unas gotas de fucsina de Ziehl a la leche que contenga formol para que adquiera un color violeta.

Únicamente podía preocuparnos si nuestro procedimiento sería lo suficientemente sensible para apreciar las pequeñas cantidades de formol que de ordinario se emplean para conservar la leche.

A este fin, tratamos de enterarnos, ante todo, de este importante detalle: cantidad de formol que se suele agregar a la leche para lograr su conservación. Pronto encontramos lo que nos interesaba. Según afirmación de los especialistas, para conservar la leche se acostumbra a agregar formol en la proporción de 1 por 500.

El problema estaba resuelto, ya que nosotros sabíamos por múltiples ensayos, que los cortes teñidos en rojo con la fucsina, adquirirían el color violeta en soluciones de formol al 1 por 1,000, y aun más diluídas.

Comenzamos entonces nuestros ensayos. Preparamos, a este efecto, unos cuantos tubos de ensayo conteniendo 10 centímetros cúbicos de leche. Agregamos a cada uno X gotas de fucsina de Ziehl. Agitamos, hasta lograr que la leche adquiriese un tinte rosa uniforme. Vertimos en

uno de estos tubos una gota de formol del comercio (solución acuosa al 40 por 100). Rápidamente la leche, antes de color rosa, adquirió un tinte violeta intenso. Luego diluímos el formol al 1 por 10, y echamos una o varias gotas de esta solución en otros tubos que tenían leche con fucsina. En todos ellos apareció el color violeta, pero con estas particularidades: la coloración violeta fué tanto más intensa cuanto mayor la proporción de formol y la aparición del color violeta tanto más tardía cuanto menor número de gotas de la solución de formol utilizaba.

El problema práctico, esto es, averiguar si la leche contiene formol en proporción de 1 por 500, estaba resuelto. Pero, además, apareció en germen otro problema que, aunque no de carácter práctico inmediato, valía la pena de estudiarle: determinar los límites de sensibilidad de la fucsina para el formol, y averiguar, por la diversidad de tonos violetas, la proporción del formol en la leche.

A este fin, dispusimos una serie de tubos de ensayo conteniendo cada uno 10 centímetros cúbicos de leche y una o varias gotas de solución de formol al 1 por 10 ó al 1 por 100, hasta obtener diluciones desde el 1 por 500 al 1 por 100,000. Agregamos después a cada tubo X gotas de fucsina de Ziehl y agitamos hasta obtener una coloración rosa uniforme. A los pocos segundos se marcó ya el color violeta en el primer tubo (1 por 500), y más tarde fué apareciendo en los demás. En los últimos tubos (1 por 50,000 y 1 por 100,000) no se hizo sensible el color violeta hasta las ocho o diez horas. Transcurrido este tiempo obtuvimos una gama de matices, desde el violeta azulado intenso al rosa violáceo débil.

Preparando otra serie de tubos en las mismas condiciones que la anterior, logramos los mismos matices violetas, y, entonces, tomando al azar los diferentes tubos

de la última serie y comparándolos con los de la primera, pudimos determinar exactamente la cantidad de formol contenida en cada uno.

Terminada ya nuestra labor, y un tanto satisfechos por el éxito obtenido, aunque no en igual grado que al finalizar otros trabajos, pura y simplemente porque éste estaba fuera de nuestro campo y apenas nos preocupó, no decidimos publicar inmediatamente este artículo, dejándolo para cuando tuviéramos terminadas otras tareas que nos interesaban bastante más.

En este tiempo, hojeando, por casualidad, la monumental obra de Denigès, *Précis de Chimie analytique*, nos sorprendió el hecho de encontrar un método colorimétrico de este sabio y, precisamente, para la determinación del formol en la leche. Nuestra sorpresa subió de punto, cuando, a la primera lectura del citado método, nos pareció que era igual al nuestro, pero nos tranquilizamos cuando, estudiándolo detenidamente, pudimos convencernos de que difería bastante.

El método de Denigès está fundado en la bien conocida propiedad de los aldehidos de recolorar la fucsina previamente decolorada.

Para hallar el formol en la leche, Denigès utiliza el reactivo de Schiff (fucsina bisulfítica) y no el reactivo de Leys que aunque más sensible, tarda más en decolorarse.

El reactivo de Schiff se prepara del modo siguiente: Se toma un gramo de fucsina y se disuelve en un litro de agua caliente. Se deja enfriar y, cuando está templada (temperatura de la mano), se vierte en un frasco de vidrio, con tapón esmerilado, y se añaden 20 centímetros cúbicos de bisulfito sódico de 36°-40° Baumé. Se agita y, al cabo de diez minutos de contacto, se vierten 20 centímetros cúbicos de ácido clorhídrico puro ($D = 1.08$) y se vuelve

a agitar. A las dos horas, la decoloración, que se completa por el tiempo, es lo suficiente para poder emplear el reactivo.

Teniendo ya preparada la fucsina bisulfítica, se investiga el formol en la leche en esta forma: A 10 ó 12 centímetros cúbicos de la leche se agrega 1 centímetro cúbico del reactivo; la aparición de un tinte carmín bastante intenso, al minuto o a los dos minutos de contacto, permite ya suponer la existencia del formol. Se dejan transcurrir cinco o seis minutos. Entonces se añaden 2 centímetros cúbicos próximamente de ácido clorhídrico puro y se agita. Si la leche no contiene formol, la mezcla final es blanco amarillenta como la leche, aunque antes de agregar el ClH tuviese ya color rojo. Si contiene formol se produce un tinte final azul violáceo, más o menos intenso, según la proporción de formol. El tinte es muy apreciable aun con dos o tres centigramos de formol (anhidro) por litro y se acentúa siempre con el tiempo.

Si se quiere más rapidez, se hierven en un tubo 2 ó 3 centímetros cúbicos de leche; se añaden X a XV gotas de fucsina bisulfítica y se enfría inmediatamente en agua. La mezcla final es azul si no hay formol, azul violeta en el caso contrario.

Se puede lograr un método colorimétrico procediendo así: 10 centímetros cúbicos de leche y otro tanto de agua; IV-V gotas de ácido acético cristalizable. Se agita, y vertiendo 5 centímetros cúbicos de reactivo de ioduro de mercurio (el que se emplea en la dosificación volumétrica de la caseína), se agita y se filtra. Al filtrado, perfectamente límpido, se añade 1 centímetro cúbico de fucsina bisulfítica. Se agita; a los dos minutos se agregan 2 centímetros cúbicos de ácido clorhídrico con un centigramo de formol por litro de leche; coloración violeta fuerte. Del líquido así obtenido se podrá dosificar colorimétrica-

mente, comparando según los métodos usuales, el tinte producido con el que dará una solución titulada de formol tratado en iguales condiciones.

Hemos detallado el método de Denigès porque nos parecía poco serio guardar silencio y, peor todavía, citar de pasada, un método que indudablemente tiene alguna semejanza, aunque remota, con el nuestro.

Obsérvese que difieren el uno del otro en estos principales detalles:

1.º El método de Denigès se funda, lo repetimos una vez más, en la propiedad de los aldehidos de recolorar la fucsina previamente decolorada; el nuestro en la propiedad del formol (ignoramos si se comportan de igual manera otros aldehidos) de transformar en violeta el color rojo de la fucsina. 2.º El método de Denigès exige el empleo de la fucsina bisulfítica, decolorada por el ácido clorhídrico, que, aunque fácil de preparar, no es de uso corriente en los laboratorios en que se hace análisis de leche; nuestro método se ejecuta con la fucsina de Ziehl, colorante que no falta en ningún laboratorio en que se haga lo más elemental de análisis bacteriológico o histológico. 3.º El método de Denigès, podría ser, no hemos intentado comprobarlo, más sensible y tan seguro como el nuestro, pero éste resulta en la práctica más fácil y más económico.

CONCLUSIONES

1.ª Nuestro método de coloración de los tejidos, con la fucsina y el formol, puede ser aplicado a la determinación cualitativa y cuantitativa del formol en la leche.

2.ª Se funda nuestro método en que el formol actúa como virofijador de la fucsina. (Transforma en violeta

el color rojo de la fucsina y la hace insoluble o poco soluble en el agua y en el alcohol.)

3.^a La leche que contiene formol, cuando se la agrega unas gotas de fucsina de Ziehl (a 10 centímetros cúbicos de leche, X gotas de fucsina de Ziehl), adquiere un color rosa que al poco tiempo (instantáneamente si la leche contiene una cantidad superior al uno por quinientos) se hace violeta, más o menos azul o más o menos rosa, según la proporción de formol.

4. Esta reacción es sensible con una dilución de formol al 1 por 100,000.

5.^a Para la determinación cuantitativa del formol en la leche, hay que preparar previamente una serie de tubos con 10 centímetros cúbicos de leche, agregar a cada uno X gotas de fucsina de Ziehl y, en fin, las gotas necesarias de soluciones al 1 por 10 ó al 1 por 100 de formol, para obtener diluciones desde 1 por 500 al 1 por 100,000, con lo que se consigue una escala de colores que va desde el violeta azulado al rosa violáceo.

6.^a Nuestro método colorimétrico difiere del método de Denigès en que éste se funda en la propiedad de los aldehidos de recolorar la fucsina previamente decolorada, y por ello es preciso usar la fucsina bisulfítica tratada con el ácido clorhídrico.

7.^a Creemos preferible, en la práctica corriente, nuestro método al de Denigès, porque, además de ser tan seguro y tan sensible, es mucho más fácil de ejecutar y más económico.

Escuela de Veterinaria. Santiago.