

Instituto de Fisiología
Barcelona
(Prof. J. Jiménez Vargas)

Nuevas reacciones coloreadas para la investigación analítica de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico

por J. MONCHE ESCUBÓS

(Recibido para publicar el 28 de Febrero de 1947)

Introducción

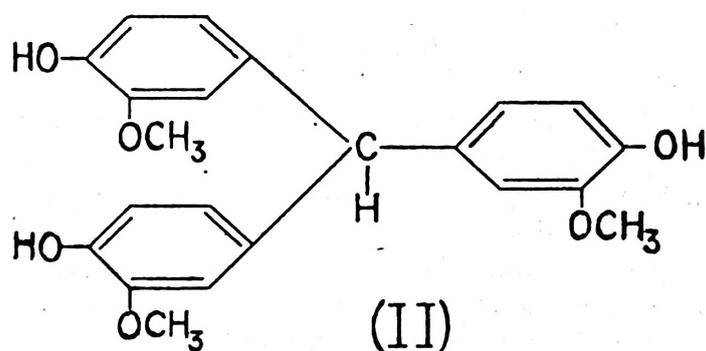
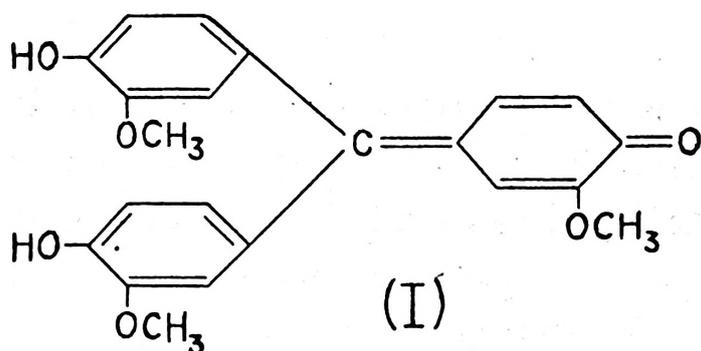
Hace algún tiempo tuvimos ocasión de estudiar la síntesis de la trimetoxidioxifucsona (I), aunque trabajando en otra dirección. Seguimos al efecto las orientaciones resumidas en la literatura que pudimos consultar (1), debido a tratarse en general de patentes, fundadas en la oxidación del triguayacilmetano (II); sustancia ésta obtenible por condensación de la vanillina con el guayacol, en medio deshidratante enérgico.

Pero en la oxidación del triguayacilmetano mediante los métodos corrientes, aun los más suaves, resulta siempre prácticamente muy difícil impedir que el proceso no afecte más que a uno de los hidróxilos de la molécula, conforme era de esperar, determinando la formación de mezclas complejas, por lo regular irresolubles.

En vista de ello decidimos efectuar la condensación del guayacol con la vanillina en presencia de un oxidante, operando en condiciones tales que el oxidante y el triguayacilmetano se fueran formando simultáneamente durante el proceso, para la inmediata y sucesiva transformación de éste en la fucsona ob-

eto de interés, siempre dentro de las orientaciones de referencia.

Y como agente capaz de liberar el oxidante del modo expuesto, se cita en la indicada bibliografía el nitrito de isoamilo, que ofrece la propiedad común a los nitritos de alcohol de descomponerse fácilmente en el alcohol derivado correspondien-



te y ácido nitroso, determinando este último la transformación del triguayacilmetano en fucsona.

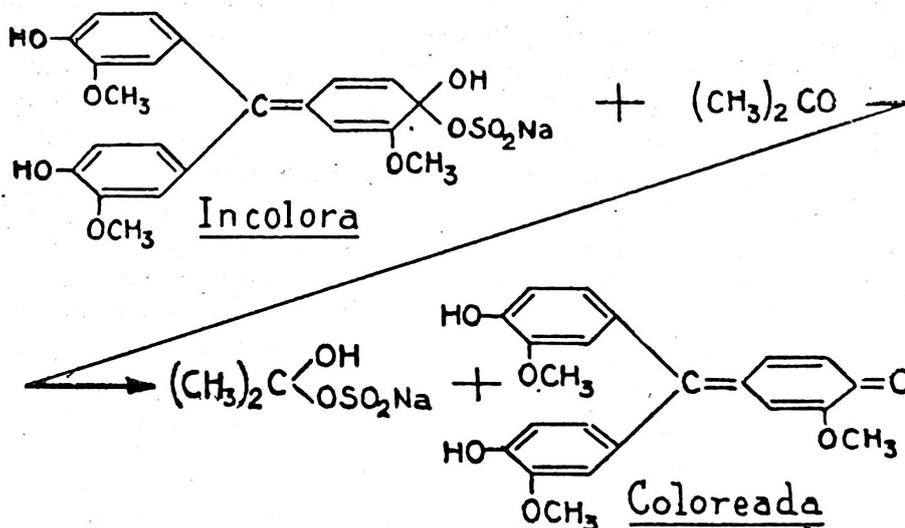
Nosotros logramos, sin embargo, mejores resultados sustituyendo al efecto el nitrito de isoamilo por el nitrito de etilo, siempre más fácil de conseguir en general, dado el hecho de requerirse en tal caso el empleo del alcohol etílico como materia de partida característica. Para la práctica del proceso basta pasar en f.l.o hasta saturación una corriente de gas clorhídrico seco a través de una disolución de la vanillina y del guayacol en una mezcla de acetato de etilo y de nitrito de etilo; obte-

niéndose así directa y paulatinamente la trimetoxidioxifucsóna, en forma de diminutos cristales de color rojo oscuro intenso y brillo metálico, P. F. 218°, con descomposición. Sus disoluciones acuosas ácidas son de color rojo escarlata claro y las alcalinas de color rojo violado intensísimo, dotadas además de notables propiedades tintóreas. En alcohol o acetona da disoluciones fuertemente coloreadas en rojo oscuro.

Una vez efectuada la síntesis de la trimetoxidioxifucsóna, la última fase de nuestro trabajo era su transformación en la combinación bisulfítica incolora correspondiente, con fines diferentes de los que constituyen el objeto del presente; pero base esencialmente fundamental del mismo.

Parte teórica

Conforme es sabido, las oxifucsónas constituyen el grupo más numeroso e importante de materias colorantes derivadas de la fucsóna, caracterizándose todas ellas por su estructura quinónica. Así, pues, cabía esperar que las combinaciones bi-



sulfíticas correspondientes mostraran, en determinadas condiciones, una estabilidad mucho menor frente a los grupos carbonilo libres, no quinónicos, de los aldehídos y cetonas; siendo

posible en consecuencia descomponer, por ejemplo, la combinación bisulfítica de la trimetoxidioxifucsina en presencia de acetona o formol, según el proceso que se acaba de formular.

Dicho proceso, perfectamente realizable en la práctica, representa, pues, en nuestro concepto, un tipo de reacción coloreada extensiva a otros colorantes de constitución quinónica, muy indicado para la investigación analítica de grupos carbonilo más activos que el de naturaleza quinónica de la materia colorante correspondiente. Ofrece, por lo tanto, cierta similitud con la reacción de SCHIFF, tan conocida en Química Orgánica, consistente en la coloración rojo violeta que dan los aldehídos al actuar sobre las disoluciones acuosas de la fucsina, previamente decoloradas mediante una corriente de gas sulfuroso; si bien con los inconvenientes propios de la preparación y manejo del reactivo, así como de la mayor complejidad del proceso correspondiente (2).

Bien sabido es, en cambio, que la formación de productos de adición con el bisulfito sódico, constituye una de las propiedades específicas más importantes de los compuestos carbonílicos; considerándose actualmente por la mayoría de autores a las combinaciones bisulfíticas resultantes, como ácidos alfa-oxisulfónicos; todo lo cual es también extensivo, naturalmente, a los grupos carbonilo quinónicos.

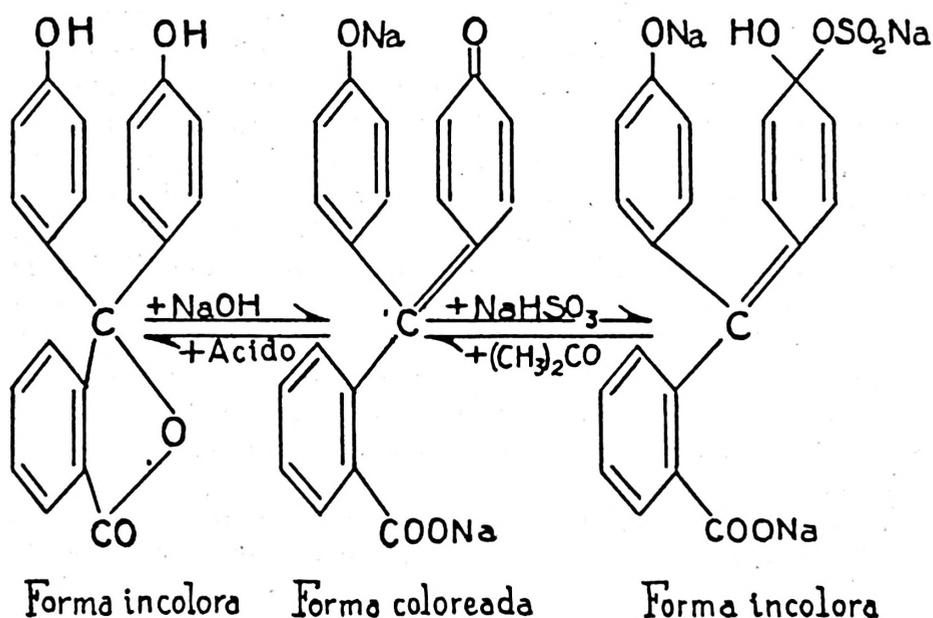
Teniendo, pues, en cuenta lo expuesto y el efecto decolorante que determina evidentemente toda adición de bisulfito sódico a los grupos cromóforos carbonílicos de los colorantes de estructura quinónica, puesto que los transforma en radicales ácidos alfa-oxisulfónicos, resulta por lo tanto lógico, en nuestro concepto, que de toda forma incolora así obtenida, sea posible pasar a la coloreada respectiva, mediante la acción de grupos carbonilo más activos, capaces de una mayor tendencia a combinar el bisulfito sódico y a regenerar de este modo la constitución quinónica de los grupos cromóforos, con desarrollo simultáneo de la intensa coloración característica, conforme hemos hecho constar precedentemente.

Se trata, en una palabra, de nuevas posibilidades de disponibilidad de reactivos del grupo carbonilo de los aldehídos y de las cetonas, caracterizados precisamente por su sencillez y facilidad de aplicación, sensibilidad extraordinaria y además por su aptitud para el estudio de la cinética de los sistemas correspondientes, en relación con problemas de estructura mo-

lecular ; a cuya orientación se viene prestando atención general, conforme es sabido, y especialmente en España para la investigación de procesos temporales con variación de color, incluso cuando éstos transcurren a gran velocidad, según técnicas fotométricas iniciadas hace unos años por los profesores GONZÁLEZ BARREDO y SENENT (3).

Y como materia del tipo expuesto, capaz de aumentar el campo de aplicación de las reacciones coloreadas objeto del presente trabajo, principalmente para la investigación de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico, hemos prestado atención especial a la fenolftaleína, dado el hecho de su uso corriente en todos los laboratorios y que, conforme es sabido, se colorea en rojo intenso, en medio alcalino, debido a la estructura quinónica de las sales correspondientes.

Tratada por lo tanto con bisulfito sódico la forma roja de la fenolftaleína, es posible decolorarla totalmente y obtener una disolución alcalina incolora en presencia de fenolftaleína ; bastando entonces agregar tan sólo trazas de acetona o de formol, aun operando a gran dilución, para que se regenere en seguida el color rojo inicial, propio de la fenolftaleína en medio alcalino ; todo lo cual puede interpretarse del modo siguiente :



Para la práctica del proceso se opera a gran dilución, conforme expondremos más adelante, en la parte experimental de este trabajo incluida a continuación.

Parte experimental

Síntesis de la trimetoxidioxifucsona

Preparación del nitrito de etilo. — La síntesis del nitrito de etilo al igual que la del acetato son tan conocidas, que en realidad nada habríamos de hacer constar aquí respecto a la del primero si no fuera por ciertas modificaciones de la técnica preparatoria, que estimamos de interés en relación con la aplicación del producto a la síntesis de la trimetoxidioxifucsona, especialmente dadas las dificultades derivadas de la manipulación del mismo por su bajo punto de ebullición de 17° y toxicidad.

En cuanto al acetato de etilo, si bien se halla destinado a actuar tan sólo como disolvente en el proceso de síntesis de la trimetoxidioxifucsona, no es menos importante su aplicación en tal sentido, puesto que determina se vaya separando la misma cristalizada durante la marcha del citado proceso, con lo que se evita así su impurificación por el triguayacilmetano inalterado siempre presente en el producto bruto de la reacción, aun en proporción muy exigua, puesto que permanece en disolución, dada la diferencia existente entre las solubilidades respectivas de ambos en dicho disolvente.

Existen varias técnicas para la preparación del nitrito de etilo; pero de ellas solamente la de WALLACH y OTTO (4) y la descrita por GATTERMANN-WIELAND (5), han merecido nuestra atención. Del examen previo de ambos métodos hemos deducido el que exponemos a continuación, más sencillo y, por lo tanto, susceptible de aplicarlo a la preparación del nitrito de etilo con fines de orden práctico:

Se dispone un aparato constituido por un matraz de tres bocas y fondo redondo, de quinientos centímetros cúbicos de capacidad, montado sobre un baño de una mezcla frigorífica de hielo y sal (para que la temperatura del mismo se mantenga siempre convenientemente baja, se va eliminando la fase líqui-

da a medida que se va formando, por aspiración a la trompa, practicada de vez en cuando).

A la boca central del matraz se le adapta un buen tapón de corcho, cuidadosamente elegido y bien prensado, golpeándolo con una maza, cuyo tapón lleva adaptado, con perfecto ajuste, centralmente, un cierre hidráulico (lleno de aceite mineral o mejor de mercurio), para dar paso a una varilla de vidrio macizo montada en forma de agitador mecánico y a la cual se adapta la cubierta del cierre hidráulico, mediante el correspondiente tubo de goma, de modo que quede asegurada la imposibilidad de fuga alguna de nitrito de etilo durante la operación, a través del orificio de paso del agitador mecánico.

A una de las dos bocas restantes del matraz, se adapta un embudo de llave, dotado de dispositivo cuenta gotas (tubo de bromo) y a la otra boca un refrigerante de reflujo de los de tubo de condensación en espiral, de modo que las espiras comuniquen con el recinto del matraz de reacción (o sea en forma de serpentín), y refrigerado con agua cuya temperatura se mantenga alrededor de unos seis grados, aproximadamente, pero nunca superior a diez.

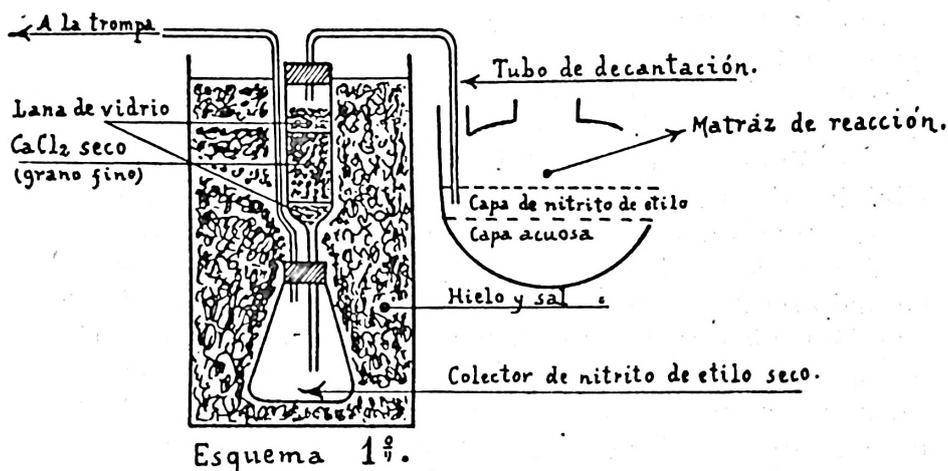
Una vez todo así dispuesto, se parte de las siguientes cantidades de productos:

Nitrito sódico	75 gr.
Agua	140 c. c.
Alcohol etílico (de 96°)	125 c. c.
Acido clorhídrico concentrado (d = 1,18).	84 c. c.

Se disuelve el nitrito sódico en el agua y sobre la disolución resultante se vierte el alcohol. La masa líquida así obtenida se introduce en el matraz de reacción y se pone en marcha el agitador (agitación enérgica).

Cuando se tiene la seguridad de que el aparato funciona perfectamente y se halla todo a punto, se introduce el ácido clorhídrico en el embudo de llave y se le va dejando gotear lentamente sobre la masa líquida contenida en el matraz de reacción, sin interrumpir la agitación enérgica de la misma durante la operación, de modo que en la adición de todo el ácido se invierta unos veinte minutos como mínimo. Terminada la adición y sin cesar la agitación de la masa reaccionante, ni la vigilancia del baño frigorífico, se cierra la llave del embudo y

se continúa la agitación y vigilancia indicadas, durante una hora. Entonces se interrumpe la agitación y se dispone previamente un aparato como el del esquema que figura a continuación:



Aspirada a la trompa la capa de nitrito de etilo en la forma que se deducirá del examen del indicado esquema, queda en el colector el nitrito de etilo obtenido, de color amarillo pálido y extraordinariamente volátil (P. E. 17°), siendo muy tóxico, por lo que debe manipularse con precaución.

Se tiene entonces preparada una botella de champaña, de las pequeñas; o de gaseosa (ambas provistas de su correspondiente tapón de goma), o de las de agua oxigenada, bien seca y enfriada exteriormente con mezcla frigorífica de hielo y sal, y se vierte en ella el nitrito de etilo obtenido, de modo que ocupe la tercera parte del volumen de la botella. Se tapa entonces bien y queda así el producto en condiciones de su utilización inmediata, en el momento conveniente, dada la pureza del mismo.

Las cantidades de producto de partida indicadas precedentemente, corresponden a un exceso de alcohol y de nitrito sódico sobre las cantidades teóricas. Conviene operar así porque el exceso de alcohol (muy ligero), miscible con el agua, no influye prácticamente en la calidad del nitrito de etilo obtenido; además, la presencia de un exceso de nitrito sódico en la mezcla

reaccionante, asegura la ausencia en ella de clorhídrico libre, susceptible de descomponer el nitrito de etilo formado.

El alcohol etílico de partida, puede ser, naturalmente, de menor graduación, mientras no se halle desnaturalizado y reúna las condiciones propias de pureza, con tal de tener en cuenta su verdadera riqueza alcohólica al medir la cantidad a emplear, procurando se halle siempre en ligero exceso, conforme hemos expuesto.

Puede, evidentemente trabajarse sin tantas precauciones, sobre todo en invierno; pero tratándose de una substancia tan volátil, las pérdidas por evaporación pueden ser extraordinarias, de no adoptarse tales precauciones, si bien es cierto que los productos de partida son de escaso valor, aunque en una serie de operaciones representarían dichas pérdidas una causa de disminución de rendimientos totalmente prevista y, por lo tanto, evitable. Rendimiento: El 81 por ciento de la cantidad teórica.

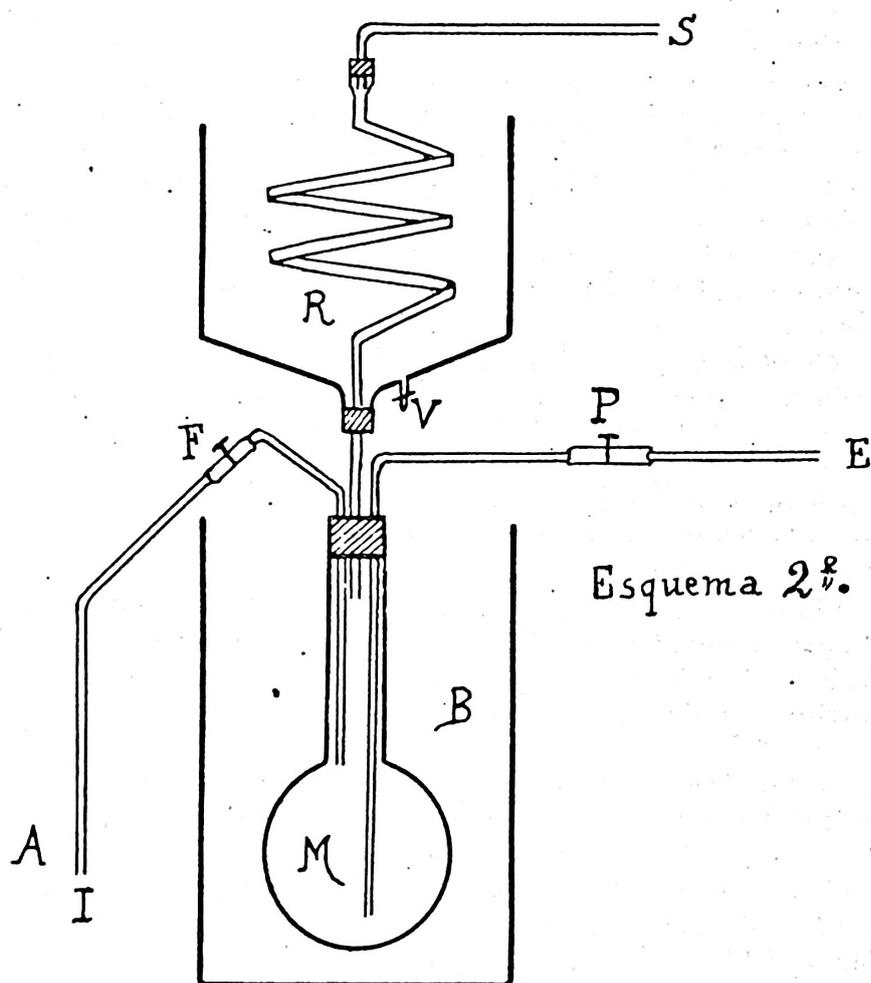
Condensación del guayacol con la vanillina. — Operamos en líneas generales de modo similar al de práctica del proceso en presencia de nitrito de isoamilo; pero pasando en cambio una corriente de gas clorhídrico seco mucho más intensa a través de la mezcla reaccionante, preparada en tal caso partiendo de las siguientes cantidades de materias:

Vanillina	30 gr.	(0,197 moles)
Guayacol sintético cristalizado	50 gr.	(2 × 0,201 moles)
Acetato de etilo	150 c. c.	
Nitrito de etilo	50 c. c.	

Las indicadas cantidades son, por lo tanto, casi exactamente las mismas que operando con nitrito de isoamilo, lo cual representa emplear un mayor exceso, en este caso, de agente oxidante, dado el menor peso molecular del nitrito de etilo, con lo que resultan previstas posibles ligeras pérdidas de producto, debido a su gran volatilidad y fácil arrastre del mismo por la corriente de gas clorhídrico durante el proceso.

Precisamente la indicada previsión y la facilidad de descomposición del nitrito de etilo en presencia de la mezcla de guayacol, vanillina y acetato de etilo — comprobable por la mayor rapidez de progreso, en el caso presente, de la intensidad de la coloración pardo-rojiza, que determina el desprendi-

miento de vapores nitrosos por el nitrito de etilo, en presencia del guayacol, hecho también observable con el nitrito de isoamilo, si bien de intensidad incomparablemente menor —, junto con la extraordinaria volatilidad del nitrito de etilo mencionado, nos decidieron a emplear el aparato del esquema que figura a continuación :



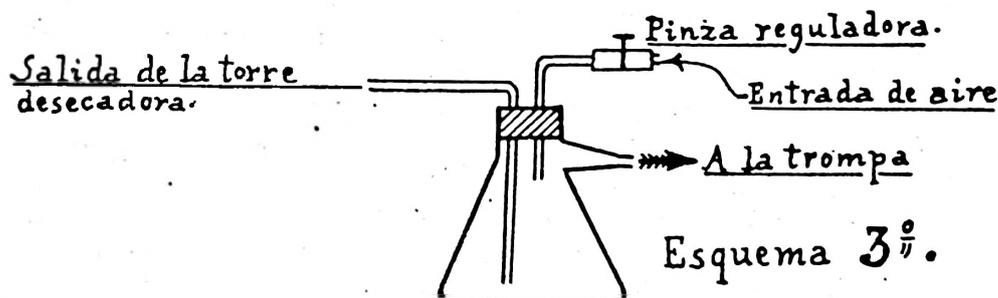
Procedimiento: En un erlenmeyer de 500 c. c. de capacidad (la misma que el matraz M), se vierten 125 c. c. de acetato de etilo y seguidamente el guayacol y la vanillina, agitando bien

la masa (conviene evitar la entrada de humedad), hasta que quede una disolución perfectamente clara y transparente, cosa que ocurre con absorción de calor, de modo que la temperatura del sistema desciende, circunstancia esta favorable, como se comprenderá fácilmente.

Por otra parte se tiene a punto el aparato del esquema de modo que B y M constituyen el baño de hielo y sal y el matraz de reacción en el que se efectúa la entrada de gas clorhídrico seco por E, a través de la pinza de regulación P, y la salida por S, a través del serpentín de condensación contenido en el baño de hielo y sal R, cuidando de dejar abierta durante su funcionamiento la llave V, a la que se adapta un tubo de goma, y que tiene por objeto dar salida continua a la disolución salina para que la temperatura de la mezcla frigorífica se mantenga convenientemente baja.

Para la obtención del gas clorhídrico empleamos un aparato de Kipp, a partir del ácido sulfúrico concentrado y de cloruro amónico fundido («sal amoníaco terrón»), con lo que se trabaja en condiciones de absoluta ausencia de humedad y de máxima regularidad y comodidad.

El tubo de salida S de gas del aparato lo enlazamos a un frasco lavador de gases (cuenta burbujas), con ácido sulfúrico concentrado y éste a su vez a dos torres desecadoras con cloruro cálcico. La última torre la unimos a un matraz de fondo redondo y cuello largo, de 500 c. c. de capacidad, montado en forma de frasco lavador, sobre un baño de mezcla frigorífica de hielo y sal. El tubo de salida del matraz lo unimos a una torre desecadora, llena de cloruro cálcico (empleamos siempre cloruro cálcico fundido, en grano fino) y el tubo de salida de la torre, a la trompa, intercalando entre ambas el aparato siguiente, ya descrito en otros trabajos nuestros:



Este aparato está constituido, como puede verse, a base de un pequeño erlenmeyer de tubuladura lateral, de los empleados para filtrar a la trompa.

Todas las conexiones de los aparatos del circuito deben hallarse perfectamente ajustadas, uniendo unos con otros mediante tubo de vidrio y la cantidad de tubo de goma estrictamente indispensable. Los tapones deben ser de buen corcho y previamente parafinados.

El tubo de entrada E se enlaza con el aparato de Kipp, productor del gas clorhídrico, antes citado, intercalando en el circuito de unión una torre desecadora idéntica a las ya mencionadas precedentemente.

Cerrada la pinza F, se da paso a una intensa corriente de gas clorhídrico, para asegurarse de que se ha expulsado todo el aire, cosa que se comprueba por el desprendimiento de clorhídrico al desconectar de la trompa el aparato del esquema 3.º. Se vuelve entonces a conectar con la trompa dicho aparato y se deja pasar a través de todo el sistema una débil corriente de gas clorhídrico.

Mientras tanto, el erlenmeyer de 500 c. c. de capacidad, que contiene la disolución de guayacol y vanillina en el acetato de etilo, se habrá conservado cerrado con un tapón con tubo de cloruro cálcico y rodeado de un baño de hielo y sal, teniendo al propio tiempo preparada una botella de nitrito de etilo, para destaparla después de haber enfriado previamente su contenido en la misma forma. Se tara entonces en una balanza el erlenmeyer con su contenido y sobre el mismo se vierte directamente desde la botella y con rapidez una cantidad de nitrito de etilo aproximadamente igual a 45 grs. (45 grs. = 50 c. c. ; $d = 0,9$). Se mezcla por agitación el contenido del erlenmeyer, que empieza a colorearse en pardo rojizo, se cierra la pinza reguladora del aparato del esquema 3.º, así como la pinza P del aparato del esquema 2.º, introduciendo al propio tiempo el tubo A por I en el interior del erlenmeyer, cosa que se consigue colocando rápidamente el erlenmeyer en la posición conveniente, de modo que abriendo la pinza F, lentamente, se introduce por aspiración todo el contenido del erlenmeyer en el matraz de reacción M, perfectamente enfriado por el baño frigorífico y seguidamente 25 c. c. de acetato de etilo para lavar todo el tubo A. F. y completar los 150 c. c. de acetato de etilo mencionados en párrafos precedentes. Se cierra entonces la pin-

za F, mientras se vuelven a abrir simultáneamente las pinzas P y la reguladora, antes mencionadas, dando así paso a una intensísima corriente de gas clorhídrico, para lo cual conviene emplear un aparato de Kipp de gran tamaño.

Se pasa la intensísima corriente de gas clorhídrico seco a través de la mezcla reaccionante, hasta la completa saturación de la misma a baja temperatura (cosa que se reconoce por observarse un intenso desprendimiento de dicho gas al desconectar de la trompa de agua el aparato del esquema 3.º, sólo a modo de ensayo). En alcanzar la saturación de la mezcla reaccionante se invierte de una a dos horas como máximo y una vez ello conseguido se continúa el paso de gas clorhídrico durante una hora más; pero ya con poca intensidad, para terminar la operación, desconectando el frasco lavador (cuenta burbujas), de la primera torre de entrada, y el aparato del esquema 3.º, mencionado, de la torre desecadora de salida, cuidando al propio tiempo de que quede abierta la pinza P del esquema 2.º de modo que resulten perfectamente protegidas contra la acción de la humedad del aire, la entrada y salida del matraz de reacción, que se abandona en tales condiciones de refrigeración y ausencia de humedad hasta el día siguiente (unas 18 horas), en que se desconecta el matraz de reacción y en el que se observa la formación de un abundante precipitado cristalino, fuertemente coloreado en rojo oscuro intensísimo, que se filtra y escurre a la trompa, se lava dos o tres veces con éter y, por último, con un poco de alcohol.

Se deja entonces el producto sobre un papel de filtro y pesa, una vez seco, 52 gr. Rendimiento = 69 % de la cantidad teórica.

Pequeños cristales de color rojo oscuro, con brillo metálico y P. F. = 218°, con descomposición, o sea en un todo semejantes a los datos de la literatura.

Recuperación del acetato de etilo. — El líquido filtrado como consecuencia de la separación de los cristales de la fucsona obtenida, es de color intensísimamente rojo oscuro. Contiene algo de triguayacilmetano inalterado, muy soluble en el acetato de etilo (a diferencia de la fucsona), en el que da la intensa coloración roja mencionada; cantidades prácticamente despreciables de fucsona, imposibles de aislar; producto amarillo de elevado punto de fusión, formado simultáneamente con la fucsona por procesos secundarios de oxidación superior (ya

mencionados en la introducción de este trabajo) y productos de transformación del guayacol y la vanillina, junto con el cloruro de etilo (formado en la descomposición clorhídrica del nitrito de etilo). El conjunto forma una masa viscosa, que se traslada a un erlenmeyer de a litro para neutralizar el gas clorhídrico disuelto que contiene, por adición de amoníaco diluído (1 : 1 en volumen, aproximadamente, pues haciéndolo con bicarbonato sódico se pierde mucho acetato de etilo arrastrado con el carbónico desprendido y la substitución de estas bases débiles por otras más fuertes no es aconsejable por el peligro de hidrólisis parcial del acetato de etilo a recuperar), cuya adición se efectúa lentamente y con buena agitación, hasta que el color de la masa a neutralizar vire del rojo oscuro al rojo violado.

Se adapta entonces al erlenmeyer un tubo de destilación con un buen refrigerante de bolas para condensación del destilado y se calienta el aparato al baño maría de vapor. Destila exclusivamente el acetato de etilo, muy de prisa al principio y más lentamente después; se interrumpe la operación cuando ya no destila prácticamente cantidad apreciable de producto (P. E. = 77°). Se recuperan así 126 c. c. de acetato de etilo, de los 150 c. c. de partida. La pérdida de producto debe corresponder, también en parte, a su aspiración por la trompa durante el filtrado de la fucsona obtenida. El destilado recuperado se halla prácticamente exento de agua.

El residuo acuoso del erlenmeyer de destilación, lo vertemos en gran cantidad de agua para precipitar con ácido clorhídrico y da así una masa resinosa dura y consistente, difícil de desdoblar; pero cuya composición es aproximadamente la indicada precedentemente, según ensayos realizados.

Observaciones. — Conviene efectuar todas las operaciones que comprende la síntesis de la trimetoxidioxifucsona con la mayor rapidez posible, de modo que desde la adición del nitrito de etilo sobre la disolución en acetato de etilo de la vanillina y del guayacol, hasta su completa y total saturación con gas clorhídrico seco, transcurra el menor tiempo posible, puesto que de la mayor o menor simultaneidad en la coexistencia de los dos procesos de condensación y de oxidación y del arrastre de los vapores nitrosos resultantes por el gas clorhídrico sobrante, depende, en resumidas cuentas, la buena marcha de

esta síntesis, como se comprenderá fácilmente después de lo expuesto al iniciar el presente tema.

No hemos citado más que brevemente el cloruro de etilo, porque dado su bajo punto de ebullición (12°), se elimina tan fácilmente del sistema que su presencia no se hace sentir como en el caso del cloruro de isoamilo (P. E. alrededor de 97°), cuya presencia es difícil de evitar y que impurifica al acetato de etilo recuperado, si bien sin grandes inconvenientes para la aplicación posterior del producto a esta síntesis, salvo en el caso de proceder de varias recuperaciones sucesivas, por su elevado contenido en cloruro de isoamilo. Este inconveniente desaparece, naturalmente, con el empleo exclusivo del nitrito de etilo, si bien es probable que la presencia de una elevada proporción de cloruro de isoamilo en el acetato de etilo de partida, no modifique sensiblemente la marcha del proceso, aunque este aspecto del mismo no ha sido estudiado, dado su escaso interés práctico en vista de los buenos resultados obtenidos con el nitrito de etilo, que por su escaso valor comparado con el anterior, es el agente oxidante más adecuado para su empleo con fines de aplicación práctica experimental.

PREPARACION Y EMPLEO ANALITICO DEL REACTIVO (*)

Para la aplicación del reactivo a la práctica analítica se opera a gran dilución, preparándolo por ejemplo mediante la adición de una cantidad previamente medida de una disolución alcohólica diluída de trimetoxidioxifucsona o de fenoltaleína, de concentración conocida, a un volumen también medido de agua destilada y agregando acto seguido otra cantidad conocida de una disolución de sosa cáustica décimo o centésimo normal, con lo que se obtendrá la disolución coloreada correspondiente.

Una vez ello realizado, se añade la cantidad conveniente, en ligero defecto, de una disolución diluída de bisulfito sódico, para efectuarlo a continuación con precisión mediante una microbureta en la medida justa estrictamente indispensable hasta lograr la decoloración, que ocurre de modo rápido al alcanzarse el punto de viraje.

(*) Con la colaboración de la señorita Rosa María Bodi.

Aun a efectos de aplicación cualitativa es siempre preferible operar con cantidades conocidas para preparar el reactivo, que proceder por tanteo, dada la mayor inversión de tiempo a que ello suele obligar. De todos modos se trata de una técnica cuya sencillez es evidente y que puede practicarse a satisfacción procediendo, por ejemplo, del modo siguiente: Se miden 100 c. c. de agua destilada, que se alcalinizan con 4 c. c. de sosa cáustica N/10 para agregar de 1 a 1,5 c. c. de una disolución alcohólica de fenoltaleína al uno por ciento, agitando el conjunto hasta que la coloración roja característica se haya difundido uniformemente. Acto seguido se añade la cantidad necesaria de bisulfito sódico diluído alrededor del 10 por ciento, hasta decoloración. La misma técnica es aplicable a la trimetoxidioxifucsona. El reactivo queda así listo para su empleo inmediato en análisis cualitativo.

DISCUSION

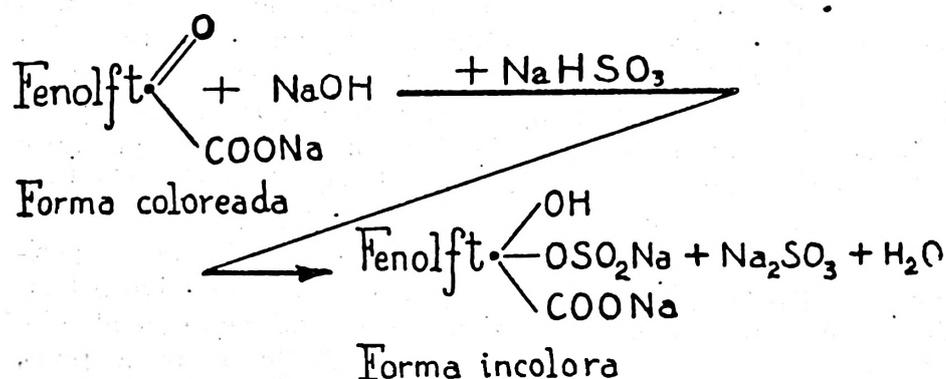
Conforme se habrá observado, el empleo del bisulfito sódico es fundamental en las reacciones coloreadas objeto del tema que viene ocupándonos, y ello obliga a tener presente que sólo existe en disolución acuosa, según demostraron FOERSTER, BROSCHE, NORBERG y SCHULZ (6), consistiendo, pues, el llamado «bisulfito sódico» en substancia del comercio, en una mezcla de piro-sulfito (80 a 95 por ciento), de sulfato y de sulfito, conforme comprobaron HARRISON y CARROLL (7); por cuyas razones es indispensable recurrir al empleo exclusivo del bisulfito sódico en disolución acuosa, conocido comercialmente con la denominación de «bisulfito sódico líquido». Se trata de un producto muy extendido y cuya concentración suele oscilar alrededor del 38 por ciento en NaHSO_3 .

Teniendo en cuenta las condiciones de realización del proceso de decoloración operando en la forma expuesta, ocurrirá éste en conjunto del modo formulado en la página siguiente.

Así, pues, mientras exista sosa cáustica libre en disolución, todo el bisulfito se transformará en sulfito neutro; la decoloración se producirá como es natural en el preciso instante en que el bisulfito se halle en exceso respecto a la sosa cáustica. En cuanto ocurre el viraje, se interrumpe la adición del bisulfito, conforme hemos expuesto, quedando siempre asegura-

da la alcalinidad del medio por el sulfito sódico neutro presente en exceso.

Toda la sensibilidad del reactivo frente a pequeñísimas cantidades de aldehídos o cetonas, depende precisamente de la adición cuidadosa del bisulfito sódico, al irse a producir la decoloración; momento este fácil de apreciar. En caso de duda o sospecha de haber excedido el punto de viraje, es fácil la corrección reproduciendo el viraje a la inversa, por adición de sosa cáustica muy diluída, mediante una microbureta, para



volver a decolorar; lo que se consigue entonces fácilmente, con gran precisión, resultando evidente la conveniencia de emplear al efecto disoluciones muy diluídas de bisulfito sódico y de sosa cáustica.

Debe por último tenerse siempre muy presente que todo posible exceso de bisulfito sódico libre en el reactivo, disminuirá la sensibilidad del mismo, por eliminarse dicho exceso combinado directamente en forma de la combinación bisulfítica correspondiente, a expensas del aldehído o cetona a analizar.

Cuanto antecede referente a la fenolftaleína es totalmente extensivo a la trimtoxidioxifucsona, cuyos hidróxilos fenólicos determinan se comporte de modo similar en medio alcalino, observándose por lo tanto con claridad manifiesta la reacción, dada la intensidad del color rojo violado correspondiente. Así, pues, las técnicas de preparación y empleo del reactivo son en tal caso por completo idénticas.

Atendiendo al proceso formulado precedentemente será fácil comprender que de la concentración de la combinación bisulfítica de la materia colorante quinónica presente en el reactivo, dependerá su capacidad de reaccionar con mayor o menor

cantidad del aldehído o cetona a analizar, liberándose en consecuencia las cantidades equivalentes en cada caso de la forma quinónica; lo que se traducirá en las correspondientes variaciones de intensidad de la coloración del reactivo, susceptibles por lo tanto de determinación colorimétrica por comparación con un tipo cuya intensidad de coloración corresponda a una concentración conocida del aldehído o cetona del líquido problema.

En relación con la distinta actividad de los grupos carbonilo quinónicos dependiente de la estructura de los restos moleculares respectivos, de posible investigación mediante los métodos de la cinética química de referencia en otro lugar de este trabajo, ofrece un ejemplo fácilmente reproducible el hecho observado por nosotros de dar coloración, aunque muy débil, con la benzofenona y algunos de sus derivados (fenil-p-toluilcetona), el reactivo preparado a base de la trimetoxidioxifucsona, mientras que en identidad de condiciones experimentales permanece por completo invariable el reactivo a base de la fenolftaleína, operando siempre naturalmente en alcohol acuoso, en el que dicha cetona es algo soluble; se trata, pues, de un ensayo muy demostrativo en nuestro concepto, toda vez que las diferencias de actividad de ambos reactivos son difíciles de apreciar, aun cualitativamente, frente a la acetona o el formol, por la simple técnica de aplicación de los mismos con fines analíticos. De todos modos la posibilidad de ensayar comparativamente el comportamiento de otras materias colorantes quinónicas similares, ofrece en nuestro concepto un amplio margen a la investigación, conforme ya hemos expuesto.

Para la aplicación de los reactivos objeto de este trabajo a la investigación analítica de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico, por ejemplo la acetona en orina, el arrastre en corriente de aire por aspiración mediante el sistema de tubos de Folín (8).— y previa la fijación necesaria del amoníaco contenido en el líquido problema, acidulándolo con ácido fosfórico diluído al 10 por ciento, según el propio Folín, o con ácido sulfúrico de igual concentración —, sólo es aplicable con fines de análisis cualitativo, toda vez que tanto el sulfito sódico (9), como el bisulfito sódico (10), se oxidan lentamente a la temperatura ambiente bajo la acción del aire húmedo, transformándose en sulfato sódico y dando el segundo, además, algo de hiposulfito (11). La acción es tan lenta sin embargo respecto a

La de la acetona arrastrada, que dicha técnica puede aplicarse a la práctica analítica con los fines indicados, bastando, pues, sustituir al efecto la reacción del yodoformo del método de FOLIN, por el burbujeo final del aire con la acetona arrastrada, a través de nuestro reactivo. Mediante ensayos dobles, uno de ellos en blanco, o sea sometiendo el reactivo a la simple acción del aire en identidad de las demás condiciones experimentales, se puede observar fácilmente, con absoluta seguridad, el efecto debido a la acetona arrastrada, por la rápida coloración del reactivo, de intensidad variable según el contenido de acetona del líquido problema.

En cambio las técnicas de destilación previa de MESSING-HUPPERT y EMBDEN-SCHMITZ, para la determinación analítica de las cetosis (12), y de la acetona y el ácido bita-oxibutírico según micrométodo de LUBLIN (13), entre otras, fundadas en practicar las determinaciones de acetona en el líquido destilado, son las adecuadas con fines de investigación analítica cuantitativa mediante nuestro reactivo, por comparación colorimétrica. Precisa sin embargo tener siempre la misma precaución ya expuesta precedentemente, de acidular la orina o líquido biológico problema a destilar, conforme es lógico y norma adoptada por los investigadores citados, de carácter general en las investigaciones analíticas de esta clase, conforme es sabido.

Pero los métodos colorimétricos fundados en reacciones coloreadas de tal intensidad y por lo tanto de sensibilidad manifiesta, sólo se prestan a la práctica de determinaciones microquímicas; toda vez que para poder observar fácilmente las variaciones de intensidad de color es preciso operar a gran dilución, según norma acostumbrada en estos casos, ya citada en el presente trabajo. Por lo tanto, la aplicación de nuestro reactivo al análisis cuantitativo representa el establecimiento cuidadoso de los micrométodos correspondientes, adaptando incluso los existentes a las condiciones experimentales más convenientes al efecto, todavía en estudio.

Resumen

Como consecuencia de estudios previos realizados con la combinación bisulfúrica de la trimetoxidioxifucsona, se describen nuevas reacciones coloreadas de otros grupos carbonilo más activos, fun-

dadas en su capacidad de actuar sobre la misma liberando la estructura quinónica inicial, propia de dicha materia colorante, con la consiguiente regeneración del color característico.

Se proponen nuevos reactivos análogos del grupo carbonilo, extendiendo este tipo de reacción a la forma roja de la fenoltaleína, que permite la fácil disponibilidad del reactivo correspondiente en los laboratorios.

Se describe detalladamente una nueva técnica de obtención de la trimetoxidioxifucsona y se hace una crítica general sobre las posibilidades de aplicación de este tipo de reacciones coloreadas a las investigaciones relacionadas con la estructura molecular, mediante técnicas fotométricas de la cinética química, y al establecimiento de micrométodos colorimétricos para la determinación cuantitativa de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico.

Summary

As consequence of previous studies with the bisulphite compound of trimethoxydioxyfucsona, we describe news coloured reactions of others carbonilic groups more actives, based in their capacity of actuation upon the same, liberating the initial quinonic structure, one's own of this colouring matter, with the consequent regeneration of the characteristic colour.

News similar reactivos of carbonilic group are proposed, extending this type of reactions to the red form of phenolphthaleine, which enables the easy disponibility of the corresponding reactive in the laboratory.

A new technics of obtainment of the trimethoxydioxyfucsona is described with a general critical about the possibilities of application of the above mentioned type of coloured reactions to the investigations reported with the molecular structure by means of photometric technics of the kinetic chemistry and to the establishment of colourimetric micromethods for the quantitative estimation of carbonilic compounds of biochemical interest.

Bibliografía

1. CHINOIN: «Triphenylmethanderivate» (Chem. Zentralblatt, I, 109, 1877 (1938); Chemical Abstracts (Amer.) 746 (1940).
2. W. SCHLENK: «Ausführliches Lehrb. der organischen Chemie», I Bd., 262-263 (F. Deuticke, Leipzig und Wien 1932); P. KARRER: «Lehrb. der organ. Chem.», 5 Aufl., 163-164 (G. Thieme, Leipzig 1937; H. MEYER: «Analyse und Konstitutionsermittlung organischen Verbindungen», 6 Aufl., 553-554 (Springer, Wien 1938).
3. J. M.^a GONZÁLEZ BARREDO y S. SENENT: Anales de Física y Química, 40, 21-41 (1944).
4. WALLACH y OTTO: Ann., 253, 251 (1889).

5. GATTERMANN-WIELAND: «Prácticas de Química Orgánica», p. 156 (Edit. Marín, Barcelona 1927).
6. FOERSTER, BROSCHE, NORBERG y SCHULZ: Z. physik. Chem., 110, 456 (1924).
7. HARRISON y CARROLL: Journ. Soc. Chem. Ind. Trans., 44, 1 (1925).
8. FOLIN: Journ. of biol. Chem., 3, 177 (1907); P. SISTO: «Microscopia e Chimica Clínica», p. 321 (Editrice Torinese, Torino 1929); J. JIMÉNEZ VARGAS y J. MONCHE ESCUBÓS: R. Esp. Fisiol., 1, 50-51 (1945).
9. LUMIÈRE y SEYEWETZ: Rev. Chim. pure et appl. 7, 111 (1904).
10. A. CHRÉTIEN: «Traité Chimie Minérale (Paul Pascal)», 6, fasc. 1, 507 (Masson, Paris 1934).
11. PECKER: J. Pharm. Chim. 5, 443 (1927).
12. P. RONDONI: «Compendio de Bioquímica», 909 (Labor, Madrid-Barcelona, 1935).
13. P. RONDONI: Id., id., p. 910.

