

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

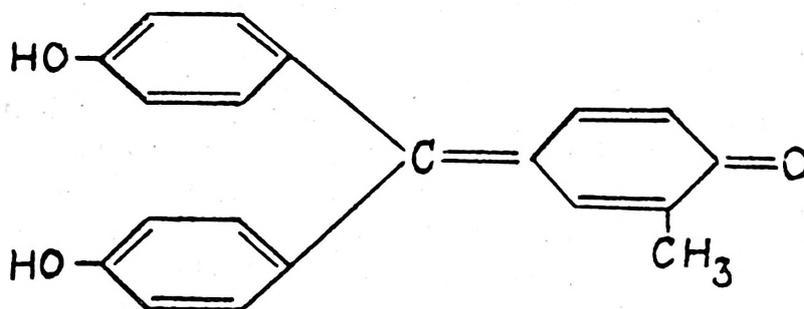
## El ácido rosólico en la investigación analítica de la acetona

por JOSÉ MONCHE ESCUBÓS

(Recibida para publicar el 30 de Abril de 1947)

Como consecuencia de los trabajos que venimos efectuando sobre nuevas reacciones coloreadas para la investigación analítica de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico, fundadas en las propiedades de las oxifucsonas descritas en un trabajo anterior (1), hemos orientado nuestras investigaciones eligiendo el ácido rosólico, entre varias oxifucsonas, debido a las propiedades específicas de dicho ácido, que expondremos a continuación y que motivan se adapte óptimamente en nuestro concepto al fin objeto del presente tema.

Al ácido rosólico le corresponde, conforme es sabido, la siguiente constitución :



Se trata, pues, de un derivado metilado de la aurina, cuyo empleo como indicador en análisis químico se halla lo sufi-

cientemente generalizado para disponer del mismo con la facilidad conveniente que la práctica aconseja en determinaciones de acetona, tan frecuentes en los laboratorios biológicos, sobre todo los clínicos.

Porque en la investigación analítica de los cuerpos cetónicos, o sea del ácido bita-oxibutírico, del ácido acetilacético y de la acetona, se emplean técnicas sobradamente conocidas, fundadas en la facilidad de transformación del primero en el segundo, por oxidación, y de éste en acetona, por descarboxilación; todo lo cual presta una importancia manifiesta a la disponibilidad de nuevos métodos rápidos, sencillos y precisos, para la determinación cuantitativa de la acetona.

Y en tal sentido, el empleo de la fenolftaleína en la forma descrita en un trabajo anterior (1), no nos ha conducido a resultados prácticos alentadores, a pesar de los ensayos realizados, debido a las condiciones de pH del medio, respecto a las de la zona de viraje de la fenolftaleína.

Efectivamente, según se recordará, el medio en que se efectúa el proceso consiste esencialmente en una disolución acuosa de la mezcla de sulfito sódico y de la combinación bisulfítica de la fenolftaleína, componentes del reactivo y ambos muy hidrolisables como es sabido.

Pero el sistema compuesto por la combinación bisulfítica y el sulfito sódico ofrece todas las características propias de una mezcla amortiguadora de concentración hidrogeniónica (2), mediante la que precisa operar en presencia de cantidades excesivas de sulfito sódico para alcanzar la zona de pH de mayor intensidad de color de la fenolftaleína, con la consiguiente disminución de sensibilidad del reactivo, caso de no efectuarlo.

Existe, pues, sin embargo, la posibilidad poco práctica de empleo inicial de mayores cantidades de la disolución de sosa cáustica; lo que obligaría después a una adición de cantidades superiores de la disolución de bisulfito sódico para neutralización; aunque cabe también asegurar la conveniente alcalinidad del medio, previa la consiguiente adición de sulfito sódico, directamente.

Ahora bien, si la zona de viraje de la fenolftaleína se halla incluida entre los límites de pH 8,3 y 10, la del ácido rosólico es muy inferior en cambio, toda vez que queda comprendida

entre los límites de pH 6,9 y 8; lo que ofrece la seguridad absoluta de disponibilidad de un reactivo de máxima intensidad de color, en las condiciones de empleo analítico del mismo, ya expuestas.

Pero el ácido rosólico posee además, en tales condiciones de máximo desarrollo de color, una coloración rojo fucsina tan intensa, que la misma se puede apreciar a gran dilución, de modo mucho más sensible en nuestro concepto que la de la fenolftaleína en las condiciones óptimas correspondientes.

Así, pues, por las razones expuestas, hemos iniciado una serie de ensayos con el ácido rosólico, encaminados al establecimiento de las condiciones óptimas de aplicación del reactivo a la determinación de la acetona en los líquidos biológicos; mostrándose en nuestro concepto perfectamente adaptable a tal fin, dada la sensibilidad del mismo; todo lo cual tenemos en estudio en la actualidad.

### Parte experimental (\*)

#### PREPARACION DEL REACTIVO

Partimos de ácido rosólico purísimo en substancia, para análisis, de la casa Merck, empleándolo en disolución alcohólica al uno por ciento.

En un matraz aforado de 50 c. c. de capacidad, se introducen:

Agua destilada . . . . .	c. s.
Disolución alcohólica de ácido rosólico. . . . .	1 c. c.
Disolución N/10 de NaOH . . . . .	1 c. c.

Una vez ello efectuado, se coloca el matraz sobre un fondo de papel blanco, para facilitar la apreciación de la disminución de intensidad de color hacia el fin de la adición de una disolución N/10 de NaHSO<sub>3</sub>; lo que debe realizarse mediante una microbureta, o sea operando del mismo modo expuesto en un trabajo anterior (1). Conviene proceder con mucho cuidado

---

(\*) Con la colaboración de la señorita Rosario Quintana.

desde que se inicia la decoloración del líquido, al principio coloreado en rojo fucsina intensísimo, a fin de suspender la adición del bisulfito en cuanto adquiere el líquido un color rosa franco, aunque débil, para dejarlo en reposo unos minutos, durante los cuales va disminuyendo automáticamente la intensidad de dicho color, hasta quedar por último de un tinte rosado muy tenue, casi incoloro. Bastará la práctica adquirida con tres o cuatro ensayos de preparación del reactivo, para no hallar dificultad alguna en la realización experimental de todo lo expuesto.

Terminada la adición del bisulfito sódico — o las posibles correcciones alcalinizando con la disolución de sosa cáustica para volver a decolorar, en el caso eventual de errores de ejecución práctica —, se completa con agua destilada el volumen del matraz aforado de referencia, hasta el enrase, quedando con ello listo el reactivo para su empleo inmediato.

#### PURIFICACION Y PESADA DE LA ACETONA

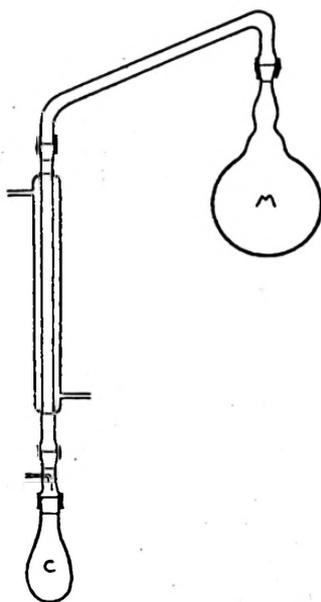
Dada la higroscopicidad de la acetona, no se presta cómodamente a la preparación de disoluciones de la misma, de concentración conocida, por pesada directa del producto o medidas volumétricas.

A fin de obviar dicho inconveniente, con las máximas garantías de pureza de la substancia, hemos preferido transformarla en su correspondiente combinación bisulfítica — norma ésta que sirve de base a las técnicas de purificación de TIMMERMANS (3) y ESCHER (4) — para pesarla en tal forma; lo que es fácil de realizar por tratarse de un sólido pulverulento, como es sabido, previa permanencia en un desecador al vacío hasta peso constante.

Pesada la combinación bisulfítica, obtenida en presencia de un exceso de acetona para evitar la de bisulfito libre en el producto, se procede a descomponerla en medio alcalino, en el mismo aparato de destilación del esquema que se incluye a continuación, en la página siguiente.

En el matraz M, lleno hasta su mitad de agua destilada, se disuelve la combinación bisulfítica de la acetona, una vez exactamente pesada; se alcaliniza suavemente la disolución resultante ( $\text{pH} = 9$ , determinado aproximadamente con el papel

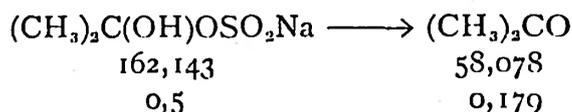
índice universal Merck), mediante la misma disolución N/10 de NaOH mencionada en otro lugar de este trabajo, descomponiéndose así la combinación bisulfítica con liberación de la cantidad equivalente de acetona, que queda disuelta en el agua contenida en el matraz y sin riesgo alguno de des-



prendimiento ulterior de sulfuroso al destilar, debido a la alcalinidad del medio.

Una vez el aparato a punto y previa la adición de unos granos de arena fina purificada, para facilitar la ebullición del líquido, se destila éste, pasando en consecuencia al principio la acetona, que en presencia de agua se fracciona muy fácilmente. La diferencia de puntos de ebullición ( $56,4^{\circ}$  y  $100^{\circ}$ ), es considerable y no existe en ningún momento mezcla azeotrópica alguna, según MARILLER (5). Recogido el destilado en el colector C, operando por lo tanto del modo usual en determinaciones de acetona procedente de líquidos biológicos, se completa el volumen del mismo con agua destilada hasta el enrase en un matraz aforado de capacidad adecuada en relación con la cantidad inicial pesada de la combinación bisulfítica de partida.

Así, por ejemplo, en uno de los ensayos efectuados, hemos partido de 500 mgrs. de combinación bisulfítica, que equivalen a 179 mgrs. de acetona :



Completando el volumen del líquido destilado, hasta el enrase en un matraz aforado de 100 c. c., se dispondrá evidentemente de una disolución patrón que contendrá 1,79 miligramos de acetona por centímetro cúbico.

#### PRACTICA DE LA REACCION COLOREADA

Ante todo debemos hacer constar que según nuestros ensayos con este tipo de reacciones coloreadas, cualquiera que sea la oxifucsona empleada en la preparación del reactivo, la máxima intensidad de color se logra agregando el reactivo sobre el problema, mas nunca procediendo a la inversa ; hecho éste perfectamente lógico como consecuencia del efecto de relación de las concentraciones respectivas correspondientes, en uno y otro caso. de las substancias reaccionantes ; observándose siempre que el color tarda varios minutos en desarrollarse y en alcanzar su máxima intensidad.

A modo de ejemplo demostrativo, partiendo de 10 c. c. de la disolución patrón antes mencionada y agregándole 2 centímetros cúbicos de reactivo, se observa el desarrollo de una coloración rosada intensa ; cuya evolución cesa al cabo de unos quince minutos en que se alcanza la máxima intensidad de color.

Disminuyendo paulatinamente la concentración de la disolución patrón hasta valores del orden de 0,1 mgr. de acetona por centímetro cúbico, se observa el desarrollo de color por comparación colorimétrica con un volumen igual de agua destilada, que contenga los 2 c. c. de reactivo, o sea dispuesta en identidad de condiciones experimentales, pero exenta naturalmente de acetona.

Aunque la posibilidad de determinación de tan exiguas

concentraciones de acetona, permite entrever la aplicación del reactivo al análisis de productos biológicos, son precisos todavía mayor número de datos experimentales para el establecimiento de los micrométodos correspondientes. En tal sentido, será fácil deducir de cuanto antecede el hecho de resultar ya sencillo disponer de disoluciones patrón coloreadas, obtenidas sin necesidad de acetona, o sea por simple adición de la disolución alcohólica de ácido rosólico a otra de sosa cáustica muy diluida, operando en condiciones previamente fijadas, de modo que la intensidad del color desarrollado equivalga a la correspondiente a una concentración conocida de acetona, por comparación colorimétrica. Pero este y otros aspectos del tema que ha venido ocupándonos, habrá de ser objeto de atención en futuros trabajos.

#### Resumen

Prosiguiendo la serie de ensayos realizados sobre aplicación de las combinaciones bisulfíticas de las oxitucsonas a la investigación analítica de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico, se orientan los trabajos correspondientes eligiendo el ácido rosólico y se demuestra que posee las propiedades específicas adecuadas a su aplicación para el establecimiento de micrométodos de determinación colorimétrica de acetona.

#### Summary

Following our experiments on the application of bisulphite compounds of oxytucsones to the analytical investigation of carbonilic compounds of biochemical interest, we orient the corresponding researchs choosing rosolic acid, and we prove that it possesses the adequate specific qualities in order to be applied for the establishment of micromethods ables for the colorimetric determination of acetone.

#### Bibliografía

1. J. MONCHE ESCUBÓS: «Nuevas reacciones coloreadas para la investigación analítica de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico» (R. Esp. Fisiol.: este mismo número).
2. H. JÖRGENSEN: «Théorie, mesure et applications du pH», p. 52-53 (Dunod, Paris 1938).
3. TIMMERMANS: Bull. Soc. chim. Belg., 24, 263 (1910).
4. ESCHER: Helv. chim. Acta 12, 48 (1929).
5. CHARLES MARILLER: «Distillation et rectification des liquides industriels», pág. 550 (Dunod, Paris 1943).

