

Instituto de Fisiología. — Facultad de Medicina — Barcelona.

## La fenolftaleína en la investigación analítica de la acetona

por J. Monche y S. Vidal-Sivilla

(Recibido para publicar el 18 de mayo de 1949)

Continuando la serie de investigaciones emprendidas desde hace tiempo por uno de nosotros (1), sobre nuevas reacciones coloreadas para la investigación analítica de combinaciones carbonílicas de interés bioquímico, hemos orientado nuestros trabajos dedicando atención exclusiva a la fenolftaleína, vistos los resultados obtenidos al operar en otras condiciones experimentales.

Conforme se recordará, los ensayos de aplicación de las reacciones coloreadas de referencia a la investigación analítica de la acetona fueron efectuados operando a gran dilución y, si bien hemos alcanzado en tales condiciones valores de sensibilidad perfectamente adecuados al fin propuesto, en especial trabajando con el ácido rosólico, se trata sin embargo de una técnica demasiado delicada y sujeta a variaciones, por factores de orden experimental, que le restan, en nuestro concepto, un evidente interés práctico como base de micro-métodos de investigación cuantitativa de acetona, no obstante su innegable utilidad con fines de análisis cualitativo.

Así, pues, en vista de todo ello y por las razones teóricas que expondremos más adelante, hemos proseguido nuestras investigaciones en condiciones operatorias por completo distintas, de modo a emplear las combinaciones bisulfíticas de los colorantes hidroxifucosónicos estudiados, obteniéndolas previamente en substancia, para preparar después los reactivos correspondientes, a base de las mismas, pero a gran concentración.

### Parte experimental

*Combinación bisulfítica de la trimetoxidioxifucsona.* — Empleamos la trimetoxidioxifucsona sintetizada del modo expuesto por uno de nosotros en el primero de dos trabajos anteriores (1). Por las razones que se hicieron constar en la discusión del mismo, utilizamos el llamado "bisulfito sódico líquido" técnico y si bien la combinación bisulfítica

correspondiente es ya conocida e incluso se facilita comercialmente en forma de específico para uso interno, su procedimiento de obtención se halla protegido por las patentes citadas en la bibliografía que se incluyó entonces y ello nos ha obligado a una labor de revisión previa para el establecimiento de la técnica que exponemos someramente a continuación y que es de aplicación general a otros colorantes oxifucsonicos.

Partimos de las siguientes cantidades de productos:

Trimetoxidioxifucsona ... ..	30 grs.
Alcohol de 96° ... ..	150 c. c.
Agua destilada ... ..	150 c. c.
Bisulfito sódico en disolución concentrada.	c. s.

Empleamos, por lo tanto, volúmenes iguales de alcohol y de agua destilada, cada uno equivalente numéricamente a cinco veces el peso de trimetoxidioxifucsona. Todo el alcohol etílico utilizado para esta preparación debe hallarse libre de aldehído y ser completamente neutro.

En un embudo de decantación, de medio litro como máximo, se introduce el alcohol y después la trimetoxidioxifucsona, agitando a mano enérgicamente el mismo con su contenido, mientras se va agregando el agua destilada en cantidad suficiente para lograr la total disolución de la fucsona. Una vez ello efectuado se acaba de añadir el agua restante hasta completar los 150 c. c. a emplear, formándose así un ligero enturbiamiento de la disolución, debido a la presencia de finísimas gotas de substancia separada en forma de emulsión muy tenue. Entonces se vierte muy lentamente y con intensa agitación (mejor sacudiendo enérgicamente) el "bisulfito sódico líquido" técnico, hasta el preciso momento en que el contenido del embudo de decantación vira del rojo al amarillo, para lo cual se suelen requerir unos 24 c. c. de dicho bisulfito, si su riqueza en  $\text{NaHSO}_3$  oscila alrededor del 38 %, que es la usual en los productos comerciales que hemos utilizado. A fin de evitar la adición de una cantidad excesiva de bisulfito, es aconsejable efectuar primero la operación en un tubo de ensayo, para que sirva de testigo del tono de la coloración amarilla correspondiente.

Terminada la adición se sacude enérgicamente la masa líquida y se deja reposar durante unas tres horas, sedimentándose una pequeña cantidad de impurezas del colorante que se separan convenientemente por filtración a la trompa y cuyo peso, una vez desecadas, es de 2,8 grs., tratándose de un producto no identificado, ya que ni contiene bisulfito sódico combinado, ni da las reacciones propias de la trimetoxidioxifucsona o del triguayacilmetano.

El líquido filtrado se traslada a una cápsula de porcelana para evaporarlo a casi sequedad al baño maría de vapor, removiéndolo de vez en cuando con una varilla, para facilitar la evaporación, hasta reducir su volumen a aproximadamente la décima parte del inicial. Alcanzada esta fase de la operación, se puede corregir cualquier exceso de bisulfito presente eventualmente, por adición de ácido clorhídrico diluido en alcohol (1 volumen del ácido concentrado, en 10 de alcohol), gota a gota, agregando sin interrumpir la evaporación, pero agitando bien la masa con una varilla, de modo que la mancha roja que aparece en el

punto de contacto de la gota con el contenido de la cápsula y desaparece con la agitación, se haga persistente, extendiéndose a toda la masa, que queda muy débilmente coloreada en rojo. Bastan entonces una o dos gotas de disolución bisulfítica para corregir el exceso de ácido y devolver al producto su color amarillo, aunque con fines de empleo analítico del mismo, debe dejarse de matiz rojizo muy ligero, a fin de evitar la presencia ulterior de bisulfito en exceso, que disminuiría la sensibilidad de dicho producto como reactivo analítico de acetona.

Una vez reducido el volumen hasta aproximadamente la décima parte del inicial, se añade un gran exceso de alcohol sobre la cápsula, removiendo y triturando bien la masa sólida resultante y se interrumpe la calefacción al baño maría. Después de frío el conjunto, se filtra, escurre y lava con alcohol a la trompa, esto último dos o tres veces, para terminar lavando con éter. El producto así tratado y escurrido, se traslada a un desecador al vacío sobre cloruro cálcico fundido y queda en forma de polvo cristalino blanco amarillento, con rendimiento prácticamente cuantitativo. Comparado analíticamente con el preparado comercial en forma de específico, resulta por completo idéntico. Rendimiento = 34 grs. de producto puro, de un 1'5 % de cloruro sódico, o sea el 89 % de la cantidad teórica, en substancia, de dicha composición.

Las aguas madres y de lavado, procedentes de la filtración a la trompa, evaporadas a sequedad, abandonan unos 6 grs. de producto muy impuro.

Debido a la diferencia entre los pesos moleculares respectivos de la trimetoxidioxifucsona y del bisulfito sódico, tienen poca importancia las posibles impurezas presentes en el bisulfito comercial.

La combinación bisulfítica de la trimetoxidioxifucsona debe conservarse en recipientes de vidrio neutro, para evitar se coloree en rojo violeta con el tiempo.

*Combinación bisulfítica del ácido rosólico.* — Procediendo del modo expuesto precedentemente, se descompone al concentrar al baño maría; por lo cual efectuamos la operación a presión reducida, mediante calefacción en baño de agua a 35-40° y en atmósfera inerte de nitrógeno. Los demás detalles operatorios son idénticos. El producto no lo hemos estudiado más detenidamente, dada la menor sensibilidad del mismo como reactivo para la acetona, al no emplearlo a gran dilución.

*Combinación bisulfítica de la fenolftaleína.* — Al no hallar dato, ni referencia alguna en la bibliografía consultada, sobre la combinación bisulfítica de la fenolftaleína, nos hemos trazado el método siguiente de obtención de la misma, como resultado de una serie de ensayos previos al efecto.

En un matraz erlenmeyer de unos 150 c. c. de capacidad, se introduce una disolución-suspensión de 1 gr. de fenolftaleína en 10 c. c. de alcohol absoluto y seguidamente 10 c. c. de una disolución de sosa cáustica cinco normal aproximada, agitando un poco el erlenmeyer hasta obtener una disolución transparente y de intenso color rojo.

Se tiene entonces dispuesta una bureta corriente, de 25 c. c. de capacidad, y mediante la misma se va añadiendo lentamente el "bisul-

fito sódico líquido" original, sobre la disolución roja de la fenoltaleína, con lo cual va esfumándose el color rojo hasta alcanzar un tinte débilmente rosado; observándose la separación del líquido fenoltaleínico en dos capas, una inferior parcialmente cristalizada, y otra superior líquida, que es la que debe quedar juntamente coloreada en amarillo pálido, a cuyo fin basta añadir de dos a cuatro gotas de bisulfito. Dicho viraje del rojo claro al amarillo pálido, es el que se alcanza, aunque se aumente la cantidad de bisulfito añadido; cuyo exceso conviene corregir, conforme hemos hecho constar en párrafos precedentes, mediante la cantidad mínima indispensable de una disolución normal de sosa cáustica hasta devolver al líquido su matiz rosado débil y añadiendo de nuevo seguidamente el bisulfito gota a gota, en la cantidad precisa para el viraje al amarillo.

Conviene operar en la forma descrita, a título de ensayo previo, para conocer la cantidad de bisulfito a añadir (difícil de calcular por tratarse de disoluciones comerciales de bisulfito sódico), de modo que el líquido fenoltaleínico quede coloreado en rosado muy débil y esta cantidad debe entonces agregarse rápidamente y de una sola vez en lo sucesivo, manteniendo siempre idénticas las demás condiciones operatorias. Luego se completa la adición del bisulfito en la cantidad precisa, mediante una microbureta; cuidando de efectuar todo ello absteniéndose de agitación alguna del líquido.

Completada la adición del bisulfito se tapa el erlenmeyer y se sacude enérgicamente su contenido durante unos quince minutos, formándose un precipitado cristalino abundante. Si dicha cristalización se inicia estando el líquido aun rosado, quedan los cristales así teñidos e inutilizados. Durante esta operación se observa un ligero desprendimiento de calor.

Se continúa entonces la técnica preparatoria, introduciendo en el erlenmeyer 50 c. c. de alcohol de 96° (muy puro), para volver a sacudir enérgicamente durante dos o tres minutos y filtrar, lavar tres veces con 25 c. c. de alcohol de 96° y escurrir bien a la trompa la masa cristalina resultante, que se seca lavándola con éter sobre el mismo embudo. Se obtiene un polvo cristalino de color blanco amarillento, cuyo peso oscila alrededor de los 10 grs. La cantidad de bisulfito sódico en disolución, del comercio, a añadir, varía según su procedencia, siendo del orden de los 12 c. c. por término medio. Esta misma técnica es aplicable al ácido rosólico, mas no así a la trimetoxidioxifucsona, cuya combinación bisulfítica es poco estable frente a la alcalinidad del medio, debida al sulfito sódico formado como consecuencia de la neutralización del bisulfito sódico por la sosa cáustica presente.

La combinación bisulfítica de la fenoltaleína, obtenida del modo expuesto, es muy soluble en agua, dando disoluciones por completo transparentes, débilmente coloreadas en rojo claro, que viran al rojo intenso en presencia de grupos carbonilo más activos, como los de los aldehídos y cetonas. Es alterable bajo la acción del aire húmedo, adquiriendo el producto sólido un color más o menos rojizo y dando disoluciones acuosas turbias. La turbidez desaparece añadiendo alcohol a las mismas, debido a la fenoltaleína libre presente como consecuencia de una des-

composición parcial de la combinación bisulfítica correspondiente. Idéntica turbidez se observa por defectos de técnica en la obtención del producto y lavado final insuficiente con alcohol.

*Análisis del producto.* — Dada la circunstancia de tratarse de una mezcla compuesta principalmente por la combinación bisulfítica y sulfito sódico, hemos efectuado dos series de seis preparaciones cada una, en condiciones operatorias por completo idénticas, salvo que las de una serie se obtuvieron empleando toda la cantidad de fenolftaleína habitual y las de la otra utilizándola tan sólo en la mínima cantidad precisa como indicador, de modo a hacer prácticamente despreciable el error por exceso en la adición del bisulfito sódico necesario hasta alcanzar entonces el punto de viraje.

Se pesó exactamente una pequeña cantidad de cada preparado para disolverlo en un volumen conocido de agua destilada, efectuándolo en el correspondiente matraz aforado. Se tuvieron así dispuestas, por lo tanto, doce muestras para análisis, procediendo a determinar yodométricamente el anhídrido sulfuroso total, acidulándolas al efecto.

Terminada dicha valoración, se añadió a todas ellas, para su alcalinización, la misma cantidad de sosa cáustica diluída y seguidamente un exceso de disolución valorada de yodo, para determinar después con tiosulfato sódico, previa acidulación, el exceso de yodo resultante en cada caso. Las diferencias halladas corresponden a la fenolftaleína yodada en tales condiciones (2), equivalente a la fenolftaleína liberada, y las halladas precedentemente, corresponden, en cambio, al anhídrido sulfuroso equivalente al bisulfito sódico combinado con la fenolftaleína.

De los promedios correspondientes resulta:

Fenolftaleína: 0'0632 gr.

SO<sub>2</sub> hallado = 0'00836 gr. = 13'22 %.

SO<sub>2</sub> calculado para C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>O<sub>7</sub>.Na<sub>3</sub>S = 13'73 %.

*Ensayo comparativo de los productos como reactivos de la acetona.* Se ensayaron las combinaciones bisulfíticas de la trimetoxidioxifucsona, del ácido rosólico y de la fenolftaleína, preparando los reactivos correspondientes del modo siguiente, según técnica resultante de las numerosas pruebas realizadas:

A.—Combinación bisulfítica de la trimetoxidioxifucsona... ..	1 gr.
Agua destilada ... ..	9 c. c.
Disolución saturada de sulfito sódico (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) temperatura ambiente ... ..	1 c. c.
B.—Comb. bisulfítica del ácido rosólico obtenida como la anterior ... ..	1 gr.
Agua destilada ... ..	9 c. c.
Disol. saturada de sulfito sódico a la temper. ambiente.	1 c. c.
C.—Comb. bisulfítica ácido rosólico obtenida misma técnica caso fenolftaleína ... ..	1 gr.
Agua destilada ... ..	10 c. c.
D.—Comb. bisulfítica fenolftaleína ... ..	1 gr.
Agua destilada ... ..	10 c. c.

Disueltas las combinaciones bisulfíticas en las condiciones que se acaban de exponer, resultaron los cuatro reactivos A, B, C y D. El primero de color rojo violeta débil y los restantes de color rojo claro. Se utilizó un sulfito sódico neutro purísimo, para análisis, exento de bisulfito.

Para el empleo analítico de los mismos se tienen dispuestas varias series de tubos de ensayo, dos con 10 c. c. de agua destilada y el resto con 10 c. c. de disoluciones muy diluidas de acetona, a concentraciones variables. En cada tubo de ensayo así dispuesto se añadió además 1 c. c. del reactivo a ensayar, determinándose colorimétricamente los aumentos de color correspondientes por comparación con la coloración del líquido tipo resultante en cada uno de los dos tubos de agua destilada (tipos dobles).

Utilizamos acetona purísima especial para análisis, a fin de preparar las disoluciones diluidas correspondientes, efectuándolo mediante volúmenes de acetona y de agua conocidos, en vez de proceder por pesada de acetona, según técnica que expuso uno de nosotros en el segundo de dos trabajos anteriores (1), debido a la necesidad de disponer de disolución acetónica tipo en cantidad con miras a una selección previa de los reactivos para ensayo de sus respectivos límites de sensibilidad, cuyo resumen exponemos a continuación:

*Sensibilidad de los reactivos A, B, C y D*

Concentraciones de acetona por litro	A	B	C	D
0,005 c. c.	—	—	—	+
0,01 » »	—	—	—	+
0,05 » »	—	—	—	+
0,1 » »	—	—	—	+
0,5 » »	—	—	—	+
1 » »	+	+	—	+
1,5 » »	+	+	+	+
2 » »	+	+	+	+

Salvo en el caso del reactivo D, al alcanzarse en los restantes el límite máximo de sensibilidad, la diferencia de color con el del tipo es tan exigua que su apreciación resulta confusa. No así en cambio en el ensayo inmediato siguiente, ya que dicha diferencia es entonces muy notable, observándose de modo clarísimo el aumento de intensidad de color correspondiente.

Las concentraciones que se indican de acetona por litro, corresponden a las de las disoluciones acetónicas originales, de las que se tomaron los diez centímetros cúbicos por cada tubo de ensayo y sin tener pues en cuenta al efecto la mayor dilución resultante de la adición del centímetro cúbico de reactivo.

Vista esa diferente sensibilidad tan notable entre los reactivos ensayados, quedaron descartados los tres primeros, para prestar nuestra máxima atención al reactivo D, que a la concentración mínima indicada permite apreciar con toda precisión el aumento de intensidad de color,

comparada con la del tipo. Efectuados los cálculos correspondientes, prescindiendo del centímetro cúbico de reactivo y teniendo en cuenta la densidad de la acetona a 15°, dicha concentración mínima equivale a 0'00398 mgr. de acetona por centímetro cúbico.

En los reactivos A y B su sensibilidad máxima alcanza en cambio tan sólo el valor de 0'797 mgr. de acetona por centímetro cúbico; cuyo valor es pues muy inferior al conseguido por uno de nosotros en el caso del ácido rosólico operando a gran dilución (8). En cambio, mediante el reactivo D, resalta de modo notable la sensibilidad obtenida; por lo que ya sólo nos ocuparemos de éste en el resto del presente trabajo.

*Determinación de la sensibilidad del reactivo D.* — La concentración de 0'00398 mgr. de acetona por centímetro cúbico, constituye un valor límite, difícil de alcanzar si no se obtiene la combinación bisulfítica de la fenoltaleína y el reactivo correspondiente, operando con el mayor esmero; lo que requiere cierta práctica previa de las técnicas preparatorias descritas.

En cambio, todos los reactivos D, dan con absoluta seguridad una intensidad de color respecto al tipo, perfectamente apreciable, aun sin necesidad de colorímetros de gran precisión, frente a concentraciones de acetona de 0'0797 mgr. por centímetro cúbico, de tal modo que cualquier reactivo D, debe comprobarse antes de su empleo, rechazando los que no permitan apreciar claramente dicha concentración de acetona.

*Preparación de la disolución tipo de acetona.* — Debido a disponer de acetona purísima para análisis, de absoluta garantía, procedemos volumétricamente, tomando con una pipeta aforada (dos aforos), 1 c. c. de acetona para disolverla en agua destilada y completar el volumen hasta el enrase en un matraz aforado de 100 c. c. de capacidad. De este modo el error volumétrico cometido es mínimo. De la disolución así obtenida, se toman 10 c. c. en las mismas condiciones para diluir con agua destilada hasta el enrase en un matraz aforado de litro y en consecuencia se dispondrá de una disolución tipo de acetona que contendrá 0'0001 c. c. = 0'07972 mgr. de acetona por centímetro cúbico.

Teniendo en cuenta la gran variación de la densidad de la acetona con la temperatura, hemos tomado el valor de 0'7972 que es el de dicha densidad a la media aproximada de 15° del ambiente en el laboratorio. Para otra temperatura ambiente debe, pues, adoptarse el valor de la densidad correspondiente al efectuar el cálculo de la concentración de acetona de la disolución tipo así preparada. Convendrá emplear, por consiguiente, material contrastado, de absoluta garantía.

De la disolución tipo de acetona se colocan 10 c. c. en los tubos de ensayo testigo y seguidamente el centímetro cúbico de reactivo en cada uno; con lo que resultarán las disoluciones patrón coloreadas correspondientes.

#### FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO

a) *Bisulfito sódico.* — Efectuados ensayos de obtención de la combinación bisulfítica de la fenoltaleína, operando con exceso y con defecto de bisulfito añadido, siempre que se trate de variaciones experi-

mentales ligeras y dentro de límites de error normales, se observan perfectamente los aumentos de color correspondientes al comprobarlos mediante la disolución tipo de acetona. Un defecto de bisulfito determina la obtención de pruebas ciegas muy coloreadas; por lo que el margen de agotamiento del reactivo disminuye. Un exceso disminuye en cambio la sensibilidad del mismo, puesto que las diferencias observadas entre la coloración de la prueba ciega (testigo) y la de la tipo acetónica, son mínimas.

b) *Acidez del medio.* — Cualquier vestigio de acidez disminuye poderosamente la sensibilidad del reactivo, por la tendencia a su decoloración. No así, en cambio, la alcalinidad, puesto que el pH del reactivo nunca es inferior a 8, determinado aproximadamente con el papel indicador universal Merck. Por lo tanto, mientras el pH del medio sea similar al del reactivo conservará éste toda su capacidad analítica de desarrollo de color. A pH superior se agota el mismo rápidamente.

c) *Acción del tiempo.* — Determina una pérdida de intensidad de color, por lo que deben efectuarse sin gran demora las lecturas colorimétricas correspondientes.

d) *Acción de la temperatura.* — Si se calienta a casi ebullición el contenido del tubo de ensayo de la prueba tipo acetónica, llega a decolorarse por completo. Introducida rápidamente el tubo en agua fría, vuelve a recuperar el color, aunque sin alcanzarse la intensidad inicial, pudiendo repetirse varias veces el ensayo con las consiguientes disminuciones de intensidad máxima de color del líquido en cada enfriamiento.

Operando a baja temperatura, alrededor de los 5°, y hasta los 25°, las diferencias de color entre los tipos y las pruebas ciegas se mantienen casi invariables, con tendencia a aumentar a medida que la temperatura descende. Operando, en cambio, previa calefacción de los tubos en baño de agua a 60°, el promedio de las diferencias de color disminuye oscilando alrededor de la mitad; con lo que la sensibilidad queda pues reducida en un 50 %.

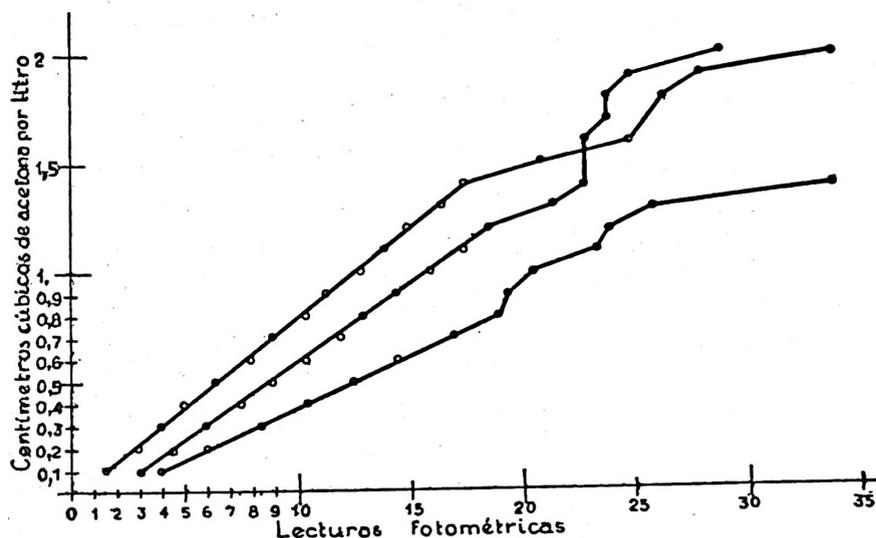
e) *Concentración de acetona.* — Si se somete la combinación bisulfitica de la fenoltaleína en substancia, extendida sobre un papel de filtro, a la acción directa de vapores de acetona a la temperatura ambiente, inclinando simplemente, por ejemplo, una botella destapada que contenga acetona, se observa que el producto sólido pulverulento adquiere una coloración roja tan fugaz que desaparece en cuanto cesa dicha acción, pudiendo repetirse el experimento numerosas veces.

Concentraciones de acetona superiores a un promedio de 1'16 gr. por litro, determinan una disminución progresiva de la sensibilidad del reactivo, debiendo considerarse éste el límite a partir del cual deja de conservarse la proporcionalidad entre las intensidades de color y las concentraciones de acetona, dentro siempre de las condiciones de aplicación del reactivo, ya expuestas, o sea preparado, según se recordará, disolviendo 1 gr. de la combinación bisulfitica fenoltaleínica en 10 c. c. de agua destilada para tomar 1 c. c. de esta disolución por cada 10 c. c. de problema acetónico.

En la gráfica adjunta se observará la variación de los valores fotométricos, en función de concentraciones de acetona, obtenidos mediante el empleo de un filtro azul, con un fotocolorímetro Evans.

En dicha gráfica se incluyen los resultados operando con tres reactivos de distinta intensidad de coloración inicial, apreciándose claramente su diferente punto de agotamiento respectivo, desde el menos al más coloreado y, por lo tanto, las zonas de aplicación de los mismos en las que existe proporcionalidad entre las concentraciones y los valores fotométricos correspondientes.

*Ensayos de aplicación del reactivo al análisis clínico.* — Las técnicas de destilación corrientes en análisis clínico para el tratamiento de los



líquidos problema en las determinaciones de acetona, son perfectamente adaptables a la aplicación del reactivo, aunque tenemos sin embargo en estudio, ya en fase bastante adelantada, la utilización del mismo en determinaciones directas, sin necesidad de destilación alguna, o empleando, además, un microaparato de reflujo con funcionamiento en circuito cerrado, para el tratamiento previo de las muestras a analizar en el caso de la determinación de los cuerpos cetónicos totales, efectuada asimismo directamente sobre el problema.

Tenemos igualmente en estudio la adaptación de técnicas de desproteinización de la sangre en condiciones de pH final del medio aptas para la aplicación directa del reactivo; pero de todo ello habremos de ocuparnos en otros trabajos también en curso de realización.

### Discusión

Conforme es sabido, la aptitud de los colorantes oxifucónicos para combinarse con el bisulfito sódico, dando los compuestos bisul-

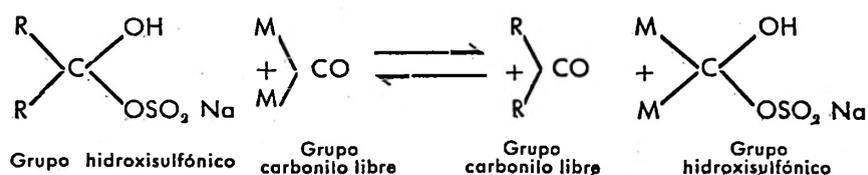
fíticos incoloros correspondientes, es una propiedad de los mismos sobradamente conocida, aunque poco estudiada, no obstante aplicarse en algunos casos al aislamiento y purificación de esta clase de colorantes (3), entre los que se incluyen asimismo las sales alcalinas rojas de la fenolftaleína, que tienen estructura quinónica, pudiendo considerarse como derivados carboxílicos de la benzaurina. En tal sentido fué ya la fenolftaleína objeto de atención especial por uno de nosotros en un trabajo anterior (1).

Por otra parte, la estabilidad de dichas combinaciones bisulfíticas, aun siendo bastante escasa, varía mucho de unos a otros colorantes, por lo menos en los que hemos estudiado (1), de tal modo que, mientras la combinación bisulfítica de la trimetoxidioxifucsona es fácil de preparar en substancia y hasta se facilita comercialmente como específico en forma de polvo cristalino incoloro, las de la aurina y el ácido rosólico son, en cambio, más difíciles de obtener cristalizadas y completamente incoloras, por lo que sólo se prestan a la práctica de las reacciones coloreadas descritas por uno de nosotros en dos trabajos anteriores (1), operando a gran dilución, conforme expusimos entonces.

Pero el proceso de adición de bisulfito sódico por los grupos carbonilo aldehídicos, cetónicos o quinónicos, aptos para la formación de combinaciones bisulfíticas, es reversible, conforme es sabido; requiriéndose con frecuencia operar en presencia de un gran exceso de bisulfito para que dicha formación se complete, y aun en tal caso no todos los grupos carbonilo — y especialmente los quinónicos, menos activos en general — permiten combinar cuantitativamente el compuesto carbonílico inicial en forma de la sal sódica del ácido *alfa*-hidroxisulfónico correspondiente a la combinación bisulfítica a obtener, ya que ello depende en cada caso de la naturaleza del aldehído, cetona o quinona de partida, o en otras palabras, de las restantes particularidades estructurales de las moléculas respectivas, que llegan incluso a inhibir en algunas la tendencia a la adición de bisulfito.

Entre los métodos de purificación de los aldehídos y cetonas, uno de los más generalizados es sin duda alguna el fundado en su transformación en combinaciones bisulfíticas, por la facilidad de descomposición de las mismas bajo la acción de los ácidos o de los álcalis diluídos, con regeneración del aldehído o cetona original. Y como método especial, igualmente generalizado, para efectuar dicha descomposición, fué introducido por Barbot (4), no hace muchos años, el empleo de las disoluciones acuosas de formaldehído. Este proceso, también muy divulgado (5) y que ocurre evidentemente sin desprendimiento alguno de anhídrido sulforoso, ni variación sensible del pH del medio, se caracteriza por su suavidad y es, pues, el más adecuado en aquellos casos en que pueda comprometerse la esta-

bilidad de la sustancia carbonílica de interés o la de los componentes que la acompañen. Constituye, por lo tanto, un proceso idéntico al formulado por uno de nosotros en un trabajo anterior (6) y único de este tipo hallado en la bibliografía consultada; ocurriendo todos ellos de acuerdo con el esquema general siguiente, en el que los dos radicales R pueden ser iguales o diferentes, o uno de ambos un átomo de hidrógeno (aldehidos), del mismo modo, naturalmente, que los dos radicales M:



Se trata evidentemente de una doble descomposición, por completo similar a los conocidos procesos de transesterificación.

Si uno de los grupos hidroxisulfónicos forma parte de la molécula de un colorante hidroxifucsonico — en lo sucesivo preferimos abandonar la denominación de oxifucsonas, muy generalizada (7), por ser más correcta en nuestro concepto la de hidroxifucsonas —, se observa que el desplazamiento del equilibrio en uno u otro sentido en el proceso que acabamos de formular, ocurre de modo evidente, por las variaciones de intensidad de color correspondientes; pudiendo aplicarse dicha propiedad a investigaciones colorimétricas, conforme expuso uno de nosotros en dos trabajos anteriores (1). Proponemos, en consecuencia, para estos procesos la denominación de *trans-hidroxisulfonaciones*, por analogía con las *transesterificaciones* y teniendo en cuenta, además, la circunstancia de haber sido perfectamente establecido, desde no hace muchos años, el hecho de consistir los compuestos de adición del bisulfito sódico a los grupos carbonilo, en las sales de los ácidos *alfa*-hidroxisulfónicos correspondientes (8).

Así, pues, concretándonos al caso de que el grupo hidroxisulfónico unido a los radicales R en el proceso antes formulado forme parte de la molécula de una hidroxifucsona, es evidente que la regularidad del desplazamiento del equilibrio en el sentido de izquierda a derecha y, por lo tanto, del desarrollo de color, se favorecerá disminuyendo la influencia de la concentración de la combinación bisulfítica incolora, constituida por el grupo hidroxisulfónico, o sea, en otras palabras, operando en presencia de un gran exceso de combinación bisulfítica, respecto a la cantidad de acetona a investigar; hechos éstos de importancia fundamental, según se comprenderá, con fines de determinación cuantitativa de acetona, dependiendo además todo ello de la diferencia entre las actividades respectivas de los dos grupos carbonilo del sistema, de tal modo que no ya entre grupos

carbonilo de tan distinta actividad como los de la trimetoxidihidroxifucsona, mencionada al principio, y los de la acetona o el formaldehído, se logra descomponer fácil y rápidamente la combinación bisulfítica de la primera, mediante los dos últimos, sino que incluso el benzaldehído y la benzofenona y derivados (fenil-p-toluilcetona y fenilansilcetona) dan la reacción coloreada con dicha combinación bisulfítica, operando en medio hidroalcohólico (1), y probablemente también con la de la fenoltaleína, obtenida según la nueva técnica.

De todo lo expuesto se deduce claramente que la seguridad de aplicación del proceso a la determinación de pequeñísimas cantidades de acetona y, por lo tanto, la sensibilidad de la reacción coloreada correspondiente, entre amplios límites, se favorecerá operando en presencia de un gran exceso de la combinación bisulfítica del colorante hidroxifucsonico elegido. Operando, en cambio, a gran dilución, del modo descrito anteriormente, por uno de nosotros (1), no hemos alcanzado resultados prácticos interesantes, a pesar de la gran sensibilidad de la reacción empleando la combinación bisulfítica del ácido rosólico (6).

Pero, conforme se expuso en ambos trabajos, no todos los colorantes hidroxifucsonicos dan la coloración correspondiente en las condiciones de pH del medio en que ocurre el proceso de transhidroxisulfonación antes formulado, ya que ello depende de que se opere o no dentro de los límites de pH correspondientes a la zona de viraje de cada colorante; lo que se logra fácilmente, según se hizo constar entonces, practicando el proceso en presencia de concentraciones convenientes de sulfito sódico neutro, cuya sal tiene reacción alcalina, por hidrolizarse en medio acuoso o hidroalcohólico, como es sabido, con la ventaja de no ejercer acción química alguna sobre el bisulfito sódico, en el proceso de transhidroxisulfonación.

Si se añaden unas gotas de una disolución alcohólica de fenoltaleína a una disolución acuosa concentrada de sulfito sódico neutro, debe adquirir la misma una coloración roja intensa, similar a la que se observaría en identidad de condiciones sustituyendo el sulfito por carbonato sódico.

Sin embargo, en algunos casos deja ello de observarse, según la procedencia del sulfito sódico neutro ensayado, incluso tratándose de productos facilitados como de gran pureza, para análisis. Ahora bien, basta añadir seguidamente entonces unas cuantas gotas de acetona absoluta, para que aparezca inmediatamente la coloración correspondiente; hecho este que lo interpretamos en el sentido de contener trazas de bisulfito sódico como impureza, las muestras de sulfito sódico de referencia. Así, pues, la fenoltaleína acusa reacción alcalina en las disoluciones acuosas de las mezclas de sulfitos y bisulfitos, operando en presencia de un exceso de acetona o de formal; hecho este de importancia en análisis químico y sobre el que no

hemos hallado dato alguno concreto o aun simples alusiones, en la literatura consultada.

En cuanto a las transformaciones que experimenta la fenolftaleína en las condiciones operatorias descritas, fueron ya formuladas por uno de nosotros en un trabajo anterior (9).

La mayor sensibilidad del reactivo fenolftaleínico operando a gran combinación de la mezcla sulfito sódico-combinación bisulfítica, componente de dicho reactivo, dependerá, en nuestro concepto, principalmente de la alcalinidad del medio, debida a la hidrólisis del sulfito sódico neutro, junto con la mayor concentración de la propia combinación bisulfítica; condiciones estas favorables a la mayor estabilidad del grupo carbonilo fenolftaleínico, por resultar disminuída la tendencia de la fenolftaleína a perderlo, o sea a pasar a la forma incolora. De esta propiedad, esencialmente diferencial, no participan, en cambio, la trimetoxidihidroxifucsona y el ácido rosólico; cuyos grupos carbonilo son siempre al efecto de estabilidad invariable, independientemente de su actividad.

Dicha sensibilidad, dentro de las condiciones operatorias descritas, motiva la atención que venimos prestando a la aplicación del reactivo al análisis clínico de acetona; dándose, además, la circunstancia ventajosa de tratarse de un método analítico muy sencillo, fundado en una reacción absolutamente específica del grupo carbonilo más activo de la acetona; por lo menos en las mezclas complejas de los líquidos biológicos dispuestos para el análisis, que la contienen, y cuyo tratamiento previo para la aplicación directa del reactivo, así como una posible simplificación de la técnica de obtención del mismo, tenemos actualmente en estudio.

### Resumen

Continuando la serie de investigaciones sobre nuevas reacciones coloreadas para la determinación analítica de substancias carbonílicas de interés bioquímico, se obtiene la combinación bisulfítica de la fenolftaleína en forma de masa cristalina pulverulenta, mezclada con sulfito sódico neutro. Se estudian sus propiedades comparativamente con las de otros compuestos similares y se ensaya su aplicación al microanálisis colorimétrico de la acetona, en las mejores condiciones de sensibilidad del reactivo correspondiente. Se propone para todos los procesos químicos de este tipo la denominación de transhidroxisulfonaciones por su analogía con las transesterificaciones.

### Summary

Following our studies on new coloured reactions for the analytical estimation of carbonilic compounds of biochemical interest, we obtain the bisulphite compound of phenolftaleine as a crystalline powder,

mixed with neutral sodium sulphite. The properties of the same are studied comparatively with other similar compounds and its use for the colorimetric microanalysis of acetone is tested in the best conditions of sensibility. We propose for all chemical process of this type the denomination of transhydroxysulfonations, accordingly its resemblance with transesterifications.

### Bibliografía

1. J. Monche: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 1 y 23 (1947).
2. Classen, Löb: *Ber.*, **28**, 1603 (1895).
3. Th. Weyl: *Les Méthodes de la Chimie Organique*, **2**, 417 y 443 (Dunod et Pinat, Paris 1914).
4. Dr. Barbot: *Compt. rend. Acad. Sciences*, **203**, 728 (1936).
5. Dr. H. Meyer: *Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen*, 557 (Springer, Wien 1938).
6. J. Monche: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 1 (1947).
7. P. Karrer: *Lehrb. der org. Chemie*, 616-620 (G. Thieme, Leipzig 1937).
8. Bibliografía citada por C. F. H. Allen: *Organic Chemistry* (Henry Gilman, Edit. in Chief) an advanced treatise, vol. 1, 645 (Wiley, New-York, 1947).
9. J. Monche: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 23 (1947).