

## DETERMINACION COLORIMETRICA DE ACETOINA Y 2,3-BUTILENGLICOL EN MUESTRAS BIOLOGICAS

Por J. Fuertes Fernández,  
A. Bernardo Alvarez,  
J. Burgos González y  
R. Martín Sarmiento

### INTRODUCCION

La determinación de acetoína (2-butanona-3-hidroxi) y 2,3-butilénglico puede efectuarse por técnicas colorimétricas o de cromatografía en fase gaseosa, aunque también es posible hacer uso de procedimientos de titulación, gravimetría o enzimáticos. De ellos, los más interesantes son los colorimétricos, si bien su aplicación a muestras biológicas plantea numerosos problemas. La acetoína puede determinarse colorimétricamente por reacción con creatina y  $\alpha$ -naftol (O'MEARA, 1931; WESTERFELD, 1945; MURDOCK, 1967), pero a estos métodos es también positivo el diacetilo, un producto metabólicamente muy próximo a la acetoína que suele acompañarla en las preparaciones y cuya aportación a la absorbancia total no siempre es fácil de tener en cuenta (MARTÍN, 1971). También puede ser determinada por reacción con p-nitrofenilhidracina, pero estas técnicas son muy inespecíficas a menos que incluyan complicados sistemas de separación cromatográfica que resultan impracticables para análisis de rutina. En cuanto al 2,3-butilénglico, su determinación puede efectuarse por oxidación a acetaldehído con periodato (DESNUELLE y NAUDET, 1945), aunque la especificidad de los métodos basados en este principio es escasa, o a acetoína con bromo (LEMOIGNE, 1920; HAPPOLD y SPENCER, 1952) valorando ésta con creatina y  $\alpha$ -naftol (SPECKMAN y COLLINS, 1968; KEEN y WALKER, 1973), pero estos procedimientos exigen una exacta neutralización del exceso de bromo, difícil de lograr; se presentan también

dificultades para descontar el diacetilo y la acetona, que se han tratado de resolver separando el 2,3-butilénglico por cromatografía en columna (SPECKMAN y COLLINS, 1968; KEEN y WALKER, 1973) a pesar de las desventajas en cuanto a dilución de las muestras y dispendio de tiempo que ello representa.

Estos problemas pueden ser resueltos determinando el 2,3-butilénglico y la acetona previa oxidación a diacetilo (LEMOIGNE, 1920; HAPPOLD y SPENCER, 1952), aunque se precisa entonces conseguir rendimientos elevados y constantes de la reacción de oxidación y disponer de un procedimiento específico para cuantificar el diacetilo producido que evite, además, las interferencias en el desarrollo del color por los agentes oxidantes empleados. Con este fundamento, HAPPOLD y SPENCER (1952) han publicado un método que da excelentes resultados cuando se pretende determinar acetona y butilénglico en disoluciones acuosas. En muestras biológicas, sin embargo, se obtienen rendimientos poco constantes en la oxidación del butilénglico y aparecen con frecuencia coloraciones anormales que dan lugar a blancos de valores erráticos y a veces extremadamente altos, todo lo cual limita mucho la utilidad práctica del sistema.

Las experiencias realizadas en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que estos inconvenientes pueden evitarse mediante una intensa desproteinización con hidróxido de cinc, acetato de plomo y ácido tricloroacético y utilizando para la determinación del diacetilo formado procedimientos no basados en su reacción con p-nitrofenilhidracina (véase HAPPOLD y SPENCER, 1952). A este último objeto se probaron diversos métodos, de los que se eligió el de OWADES y JAKOVAC (1963), modificado en algunos detalles. En este trabajo se describe la técnica experimental finalmente adoptada y algunos datos sobre su sensibilidad, precisión y especificidad.

## METODO

### Reactivos

Sulfato de cinc 3 N.

Hidróxido sódico 3 N.

Disolución saturada de acetato de plomo.

Ácido tricloroacético cristalizado.

Agua de bromo: 4,17 g de bromo / 100 ml agua, preparada y mantenida en la oscuridad.

Sulfato ferroso al 20 % (p / v): prepárese inmediatamente antes de su uso.

Cloruro férrico al 50 % (p / v).

Ácido sulfúrico 18 N.

Fosfato bipotásico al 33 % (p / v).

Hidroxilamina tamponada: preparada mezclando las disoluciones a, b y c en la proporción 2 / 4 / 1 (v / v / v). Disolución a: 33 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  en 100 ml de agua destilada. Disolución b: 11 g de  $\text{CINH}_2\text{OH}$  en 250 ml de agua destilada.

Disolución c: 35 g acetato sódico en 100 ml de agua destilada.

Acetona fosfato: preparada disolviendo en agua destilada 29 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , añadiendo 40 ml de acetona y ajustando el volumen, con agua destilada, a 200 ml.

Tartrato alcalino: preparado mezclando, en la proporción 22 / 3 (v / v), una disolución saturada a 20° C de tartrato sódico potásico con otra de hidróxido amónico concentrado.

Disolución ácida de sulfato ferroso: preparada disolviendo 5 g de  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de una disolución acuosa de ácido sulfúrico al 1 %. Este reactivo debe estar recientemente preparado, siendo necesario descartarlo cuando comienza a desarrollar un ligero color amarillento.

### Desproteinización

Depositense en un tubo de centrífuga 8 ml de muestra, añádanse 0,8 ml de sulfato de cinc 3 N y 0,8 ml de hidróxido sódico 3 N, agítense intensamente y elimíñese el precipitado formado por centrifugación a unas 500 × g durante 10 minutos. Al sobrenadante, añádanse 0,8 ml más de la disolución saturada de acetato de plomo, centrifúguese de nuevo y decántese sobre un tubo de centrífuga que contenga 0,8 g de ácido tricloroacético sólido. Agítense hasta disolverlo y clarifíquese de nuevo por centrifugación a unas 1.000 × g durante 10 minutos. Estas operaciones deberán efectuarse a temperatura ambiente y en tubos destapados para facilitar la evaporación de carbonilos volátiles, lo que permite eliminar gran parte de las sustancias capaces de reaccionar con la hidroxilamina y formar compuestos coloreados con el amoníaco y el sulfato ferroso.

### Determinaciones de acetona

Viértase en el tubo A del sistema de destilación de la fig. 1 (I. MEDARDE, citado por MARTÍN, 1971) 4,5 ml de muestra desproteinizada contenido entre 5-150 µg de acetona, 0,5 ml de la disolución 18 N de sulfúrico y 1 ml de la de cloruro férrico al 50 %. Tápese el tubo con un tapón de goma, caliéntese durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo y, transcurridos éstos, enfriese en baño de hielo. Para determinar el diacetilo formado, móntese sobre el tubo la pieza B de la fig. 1 y sobre ésta el recipiente de recogida (C), al que debe añadirse previamente 1,5 ml del reactivo de hidroxilamina tamponada. Sumérjase el tubo A en un baño de agua a 65° C y destílese en corriente de nitrógeno, a un flujo de 100-150 ml / min (alrededor de seis burbujas / seg) durante 90 minutos. Concluida la destilación, lávese interior y exteriormente el conducto que penetra en el tubo C con 0,5 ml de fosfato bipotásico al 33 %, añádanse al destilado e introduzcase éste en un baño de agua a 75° C durante 15 minutos; adicionesele luego, aún en caliente, 0,5 ml del reactivo de acetona fosfato y, tras enfriar a temperatura ambiente por inmersión en un baño de agua fría, 1,5 ml de tartrato alcalino y 0,1 ml de la disolución ácida de sulfato

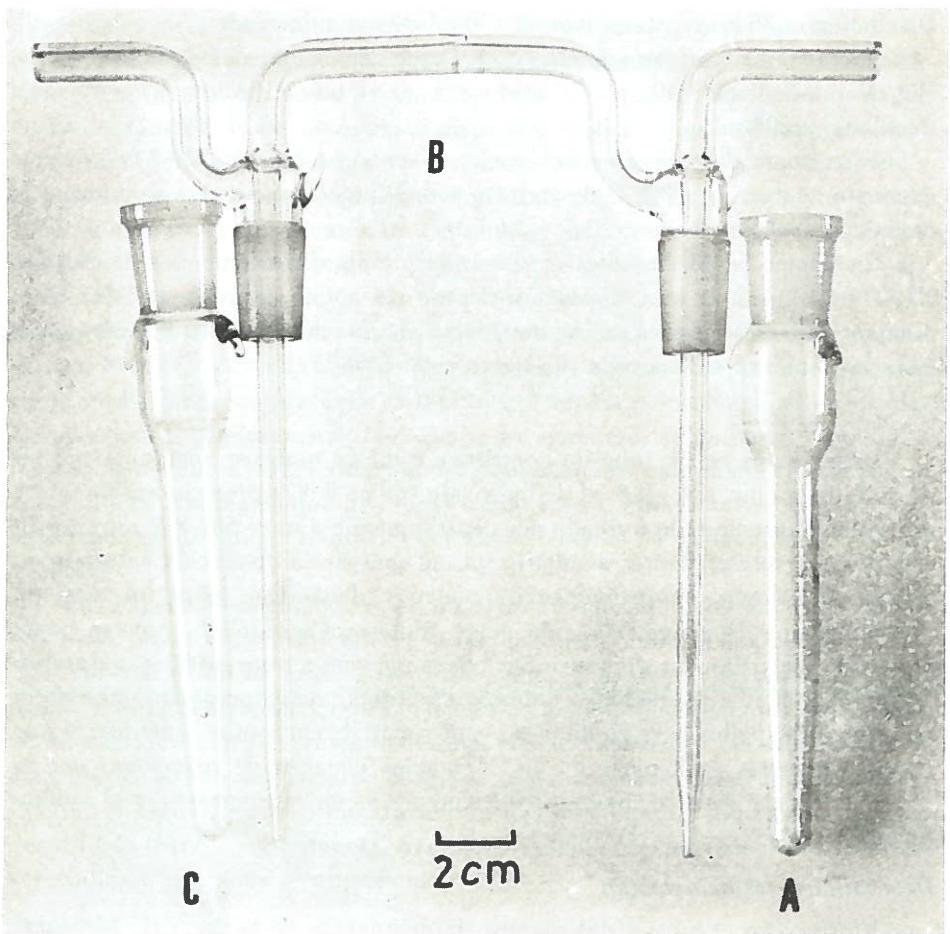


Figura 1.—Dispositivo utilizado para la destilación del diacetilo.

ferroso, agitando inmediatamente. Ajústese el volumen a 5 ml con la disolución de fosfato bipotásico al 33 % y mídase la absorbancia a  $530 \text{ m}\mu$  contra un blanco exento de acetoína tratado de igual forma, refiriendo las lecturas a una gráfica patrón preparada sometiendo al proceso descrito (incluyendo las operaciones de desproteinización) disoluciones de acetoína de concentración conocida. El rendimiento de la oxidación de la acetoína es del 100 %, pero hacia el 5 % del diacetilo formado se destruye durante la destilación en presencia de cloruro férrico y ácido sulfúrico.

El diacetilo preexistente se pierde en un 97 % durante el proceso de desproteinización, por lo que no es de esperar contribuya significativamente al color desarrollado; si su concentración inicial fuese tan alta que aún así pudiera producir lecturas significativamente por encima de las reales (lo cual es muy improbable porque las concentraciones fisiológicas de diacetilo son

normalmente mucho más bajas que las de acetoína) puede eliminarse por completo antes de proceder a la oxidación de la acetoína mediante un suave burbujeo de nitrógeno durante 30 minutos en un baño de agua a  $70^\circ \text{ C}$ .

#### Determinación de 2,3-butilénglico

Transfiéranse 2,75 ml de muestra desproteinizada que contenga 5-150  $\mu\text{g}$  de la suma de acetoína más butilénglico al tubo A del destilador de la fig. 1, añádase 1,25 ml de agua de bromo y caliéntese al baño maría durante tres minutos; enfriese en baño de hielo hasta que alcance la temperatura ambiente, a la que ha de mantenerse durante 15 minutos, y pipétense luego 0,90 ml de sulfato ferroso al 20 % para neutralizar el bromo en exceso. Todas estas operaciones *han de llevarse a cabo con protección absoluta contra la luz*.

Añádanse luego 0,6 ml de cloruro férrico al 50 % y 0,5 ml de ácido sulfúrico 18 N, caliéntese durante 15 minutos en agua hirviendo, déjese enfriar en un baño de hielo y efectúense las operaciones ya descritas en el apartado anterior para la determinación del diacetilo formado, refiriendo los resultados a una gráfica patrón obtenida con muestras de concentración de butilénglico conocida tratadas de idéntico modo, incluyendo las operaciones de desproteinización.

El rendimiento de la transformación butilénglico-acetoína (y el de ésta a diacetilo) es del 100 %; los resultados obtenidos corresponden, por tanto, a la suma de acetoína más butilénglico, pudiendo descontarse la acetoína inicial previa determinación de la misma por el procedimiento ya descrito. En el tratamiento con bromo se pierde el 80 % del diacetilo preexistente en la muestra, por lo que la posibilidad de que éste dé lugar a lecturas falsamente altas es en extremo remota; en esta fase se destruye también hacia el 15 % de la acetoína (tanto de la procedente del butilénglico como de la inicialmente presente) por lo que, para lograr resultados reproductibles, conviene controlar con cierto cuidado las condiciones en que se lleva a cabo.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fig. 2 muestra la relación entre la intensidad del color formado y la concentración de acetoína o butilénglico. Como puede verse las determinaciones en sistemas biológicos complejos dan valores sensiblemente iguales a los obtenidos en disoluciones acuosas simples. Tampoco se ven afectadas por el cambio en las partidas de reactivos, siempre que la disolución ácida de sulfato ferroso haya sido adecuadamente preparada y no se encuentre alterada. Puede observarse también que la sensibilidad del procedimiento aquí descrito resulta ligeramente inferior a los más sensibles métodos colorimétricos para la determinación de acetoína y 2,3-butilénglico, que alcanzan 0,2 p.p.m. (WESTERFELD, 1945; MURDOCK, 1967). No obstante, es sobradamente suficiente para los niveles normalmente encontrados en cultivos microbianos (véase, v. g., DE LEY,

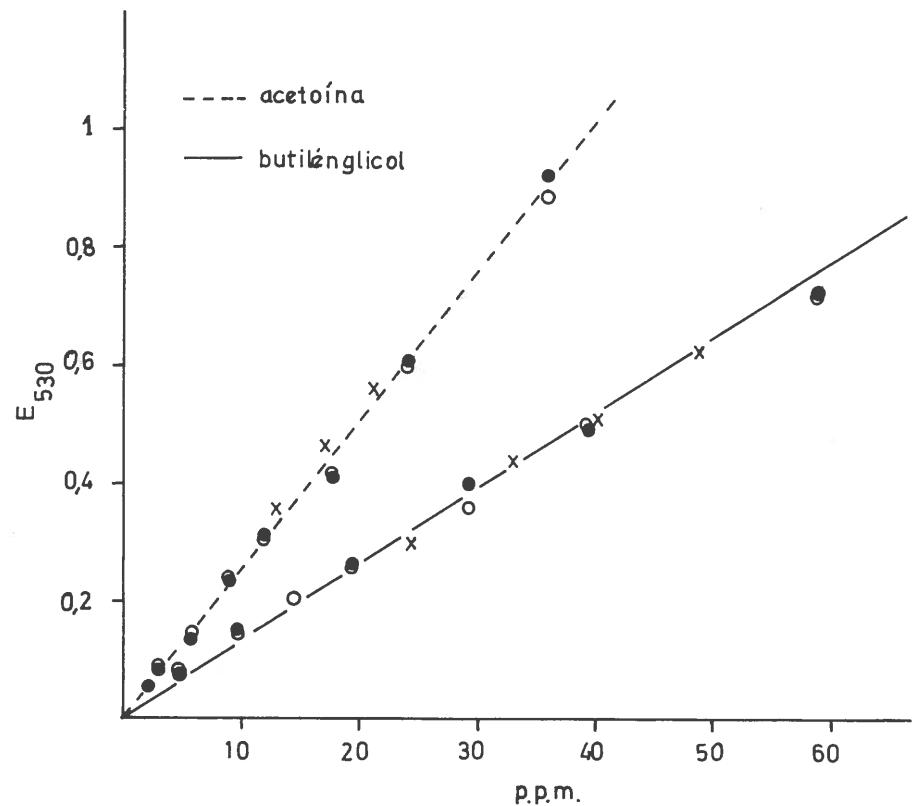


Figura 2.—Gráficas patrón para las determinaciones de acetoína y butilénglico. Los patrones con concentraciones conocidas de los citados productos fueron disueltos en agua (x), papilla 1 : 4 (p / v) de hígado de bóvido (●) y extracto acuoso de tejido muscular de gallina con 1 mg de proteína / ml purificado por filtración en Sephadex G-75 Superfino (○).

1959; WALSH y COGAN, 1973; YADAV y GUPTA, 1975), extractos de vegetales superiores (HILL y col., 1954; LEDINGHAM y NEISH, 1954) y todo tipo de alimentos y bebidas fermentadas (LEDINGHAM y NEISH, 1954) y aproximadamente suficiente para los esperables en diversos tejidos animales (DAWSON y HULLIN, 1954; LEDINGHAM y NEISH, 1954). En cualquier caso, su sensibilidad puede ser fácilmente aumentada hasta el nivel necesario destilando volúmenes mayores o recogiendo sucesivamente en un sólo trap los destilados de varias alícuotas.

El coeficiente de variación de los valores obtenidos al analizar treinta y cuatro alícuotas de disoluciones acuosas de 2,3-butilénglico que contenían entre 4,5 y 60 p.p.m. fue 5,64 %. Para los análisis de veinticinco muestras entre 3 y 40 p.p.m. de acetoína, se calculó en 5,61 %. En ambos casos, pues, la precisión es excelente, si bien por debajo de los niveles indicados los resultados obtenidos son bastante más imprecisos y tienen un valor sólo approximativo.

Los estudios realizados acerca de la especificidad del método se resumen en la Tabla 1. Dado que el tratamiento con bromo destruye en parte diversas sustancias que, en principio, podrían resultar parcialmente positivas y oxida otras a compuestos capaces de serlo, los valores obtenidos son algo diferentes cuando se sigue la técnica de determinación de acetoína o la de 2,3-butilénglico, pero en ambos casos el procedimiento propuesto muestra ser muy específico. Como puede observarse, la respuesta de los compuestos ensayados, algunos de ellos químicamente muy próximos al butilénglico y la acetoína, es prácticamente nula en todos los casos. Incluso el diacetilo y la 2,3-pantanodiona desarrollan una coloración de sólo el 3-4 % de la correspondiente a la acetoína y hacia un 1 % de la del butilénglico, por eliminarse en la etapa de desproteinización y, en su caso, por ser destruidos por el bromo. Los demás productos analizados dan también respuestas muy débiles o negativas, que hacen esperar no planteen problema alguno en la evaluación de la acetoína y el butilénglico en muestras biológicas; en cualquier caso, muchos de ellos son fácilmente evaporables por lo que, de ser necesario, podrían eliminarse por burbujeo de nitrógeno como ya se ha señalado.

TABLA 1  
Intensidad del color desarrollado por diferentes productos

Productos	Color desarrollado* al aplicar el procedimiento de determinación para:	
	Acetoína	2, 3-butilénglico
Etilénglico	0	0
1,2-propanodiol	0	0
Glicerol	0	0
1,3-butanodiol	0	0
Dietilénglico	0	0,7
Diglicerol	0	0
Gioxal	0	0
Glicolaldehído	0	0
Metilgioxal	4,6	1,2
Gliceraldehído	0	0
Piruvato de metilo	1,1	0
Piruvato de etilo	0	1,1
Lactato de etilo	0	0
Acetona	0	0,7
2-butanona	1,8	5,3
Diacetilo (2,3-butanodiona)	3,5	0,7
3-pantanona	0,6	1,4
Pentano-2,3-diona	4,2	1,7
Pentano-2,4-diona	0	1,8
Hexano-2,5-diona	1,4	0

\* Expresado en porcentaje sobre el correspondiente a igual cantidad de acetoína ó 2,3-butilénglico, según el método seguido.

En términos generales puede concluirse que, para la determinación de acetoína, el método aquí descrito es, comparado con los habituales de reacción con creatina y  $\alpha$ -naftol (WESTERFELD, 1945; MURDOCK, 1967) o con p-

nitrofenilhidracina (HAPPOLD y SPENCER, 1952), superior en especificidad, semejante en precisión y semejante (HAPPOLD y SPENCER, 1952) o algo inferior (WESTERFELD, 1945; MURDOCK, 1967) en sensibilidad, resultando también un tanto más laborioso; es, pues, una alternativa muy interesante en los numerosos casos en que la sensibilidad no es crítica, sobre todo cuando se trata de analizar mezclas complejas de sustancias reduciendo al mínimo los riesgos de interferencias. Por otra parte, esta técnica se encuentra especialmente indicada en el análisis de butilénglico en muestras biológicas, evitando por completo la necesidad de separar la acetoína y el diacetilo por cromatografía en columna y los problemas derivados de las interferencias con el desarrollo del color por los oxidantes utilizados.

#### RESUMEN

Se describe un método para la determinación colorimétrica de entre 1-60 p.p.m. de acetoína y 2,3-butilénglico en muestras biológicas, basado en la oxidación a diacetilo con cloruro férrico y bromo, tras una intensa desproteinización con hidróxido de zinc, acetato de plomo y ácido tricloroacético, y en la valoración del diacetilo formado por reacción con hidroxilamina y sulfato ferroso en presencia de amoníaco; es altamente específico.

#### SUMMARY

A colorimetric method to determine acetoine and butylene glycol in the range 1-60 p.p.m. in biological samples is described. The method includes a deep deproteinization with zinc hydroxide, lead acetate and trichloroacetic acid followed by acetoine and butylene glycol oxidation to diacetyl by treatment with ferric chloride and bromine and evaluation of the formed diacetyl by its reaction with hydroxylamine and ferrous sulphate in the presence of ammonia.

#### BIBLIOGRAFIA

- DAWSON, J. y HULLIN, R. P. (1954).-*Biochem. J.*, **57**, 177.  
DE LEY, J. (1959).-*J. Gen. Microbiol.* **21**, 352.  
DESNUELLE, P. y NAUDET, M. (1945).-*Bull. Soc. Chim.* **12**, 871.  
HAPPOLD, F. C. y SPENCER, C. P. (1952).-*Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 18.  
HILL, E. C., WENZEL, F. W. y BARETTO, A. (1954).-*Food. Technol.* **8**, 168.  
KEEN, A. R. y WALKER, N. J. (1973).-*J. Dairy Res.* **41**, 65.  
LEDINGHAM, G. A. y NEISH, A. C. (1954).-En «Industrial Fermentations» (Editores: Underkofler, L. A. y Hickey R. J.). Vol. II. Pág. 27. Chemical Publishing Co., N. Y.  
LEMOIGNE, M. (1920).-*Comp. Rend.* **170**, 131.  
MARTIN, R. (1971).-*Tesis Doctoral, Fac. de Vet. León*.  
MURDOCK, D. I. (1967).-*Food. Technol.* **21**, 643.  
O'MEARA, R. A. Q. (1931).-*J. Path. and Bact.* **34**, 401.  
OWADES, J. L. y JAKOVAC, J. A. (1963).-*Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* **22**.  
SPECKMAN, R. A. y COLLINS, E. B. (1968).-*Anal. Biochem.* **22**, 154.  
WALSH, B. y COGAN, T. M. (1973).-*Appl. Microbiol.* **26**, 820.  
WESTERFELD, W. W. (1945).-*J. Biol. Chem.* **161**, 495.  
YADAV, N. K. y GUPTA, K. G. (1975).-*Appl. Microbiol.* **30**, 889.