

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA

METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA DETERMINACION DE TIOLES DE BAJO PESO MOLECULAR

Artacho Martín-Lagos, R. y Olea Serrano, M.F.

RESUMEN

Se ha establecido un método espectrofotométrico para la determinación de tioles de bajo peso molecular con nitroprusiato sódico y en presencia de una sal soluble de cinc.

Se comparan los resultados obtenidos al utilizar agua y formamida como disolventes.

SUMMARY

A spectrophotometric method has been developed for the determination of low molecular weight thiols with sodium nitroprusside and in presence of a soluble salt of zinc.

It is compared the results using water and formamide as solvents.

INTRODUCCION

Se ha puesto a punto una técnica espectrofotométrica para la determinación de derivados azufrados, similares a los que se encuentran en el aceite esencial de diversas especies del G. *Allium*, fundamentalmente *A. cepa* y *A. sativum* (cebolla y ajo) ya que parece ser que el consumo excesivo de estos vegetales, puede tener incidencia en el bocio endémico (1) que se presenta en núcleos de población de la Alpujarra granadina.

In vitro se ha observado una disminución en la actividad hormonal de la glándula tiroidea, al agregar a un cultivo de dicha glándula sustancias ricas en grupos -SH y -S-S-. (2).

Entre las técnicas espectrofotométricas más usuales para determinar dichos compuestos se pueden citar: métodos IR (3), formación de complejos con níquel en medio de acetonitrilo (4) con ácido fosfomolibdico y acético glacial (5), utilización del reactivo de Folin (6), α , β dinitroestilbeno (7), cloramina T (8), nitroprusiato sódico (9), brucina y metayodato sódico (10), 1,2,4-trinitrobenzeno (11), difenilpicrilhidracilo (12) y tidan como reactivo fluorescente (13).

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos

- Espectrofotómetro UV/V Perkin-elmer, mod. 551 S, con registrador gráfico, mod. 561.
- El pH se ha determinado con un Radiometer, mod. pH-Meter 26.

Reactivos

- Disolución de 1-propanotiol (Merck) 5.10^{-4} M en alcohol metílico.
 - Disolución de 2-propanotiol (Merck) 5.10^{-4} M en alcohol metílico.
 - Disolución de 1-butanotiol (Merck) 5.10^{-4} M en alcohol metílico.
 - Disolución de nitroprusiato sódico al 0,4%: 0,4 g. de nitroprusiato sódico (Panreac) hasta 100 ml. con agua destilada; se prepara una disolución de igual riqueza con formamida (Panreac) como disolvente.
 - Disolución de acetato de cinc (Panreac).
- Todos los demás reactivos utilizados son de pureza analítica.

Procedimiento experimental

El ión $S^{=}$ reacciona con nitroprusiato sódico en medio alcalino, originando una coloración roja (14):



Este complejo se hace más estable en presencia de cationes tales como Zn(II), Cd(II), Pb(II), Cu(II), Ag(I) y alcalinotérreos. Basándonos en estos hechos, así como en la utilización de nitroprusiato sódico como revelador de placas cromatográficas en la investigación de grupos -SH, (15), se ha estudiado la reacción del nitroprusiato sódico con diversos derivados mercapto: 1-propanotiol, 2-propanotiol y 1-butanotiol, tanto en disolución pura como en disolución conjunta.

Reacción grupo tiol con nitroprusiato y diversos cationes

La reacción se ha ensayado a partir de 3 ml. de disolución metanólica 5.10^{-4} M de cada uno de los tioles a lo que se agrega 2 ml. de disolución de nitroprusiato sódico al 0,4% en agua o en formamida. En estas condiciones no aparece coloración alguna.

La reacción se estabiliza, dando lugar a una coloración violeta, al agregar a los reactivos anteriormente citados 1 ml. de disolución de $Zn(Ac)_2$ al 1%. Se enrasa a 10 ml. en matraz aforado con agua destilada o bien con formamida.

El ensayo realizado en iguales condiciones con disolución de $Ca(NO_3)_2$ originó una coloración violeta intensa y fugaz, con una estabilidad inferior al minuto.

La reacción con sales de Cd(II), Ag(I), Pb(II) y Cu(II) fueron igualmente poco estables.

Efecto del pH en presencia de Zn(II)

El pH ácido (HCl diluido hasta pH=2) es negativo sobre la reacción ya que no aparece la coloración violeta observada en los ensayos anteriores.

La elevación del pH con disoluciones reguladoras de pH=5 y pH=6, ambas de ácido fosfórico, permite el desarrollo de una débil coloración violeta, estable por un tiempo medio de 10 minutos. En los ensayos realizados sin regular el pH (pH próximo a 7) la coloración es más intensa y se mantiene estable 20 minutos.

A pH alcalino, alcanzado con disolución diluida de NaOH, el Zn(II) precipita al estado de hidróxido y cuando se reguló con $\text{C1NH}_4/\text{NH}_3$ no apareció coloración alguna^a debido al complejo $(\text{Zn}(\text{NH}_3)_4)^{2+}$.

Estos ensayos descritos para el Zn(II), se han realizado con los demás cationes sin conseguirse con ninguno de ellos estabilizar la coloración.

Efecto del disolvente

Esta reacción se ha estudiado en medio acetona, etanol, agua y formamida, y solamente en los casos en que el disolvente tiene una elevada corriente dieléctrica (agua = 93,6 y formamida = 118,3) se produce la reacción; posiblemente debido a que se favorece la disociación del grupo mercapto.

Estudio de la Ley de Beer

Los tioles primarios 1-propanotiol y 1-butanotiol presentan un máximo de absorción a 500 mm.; en el caso del 2-propanotiol, se observa un ligero efecto batocrómico e hipocrómico con respecto a su isómero 1 y el máximo presenta un desplazamiento a 505 mm.

El tiempo óptimo para realizar las medidas de absorbancia es de 20 minutos.

En la Tabla I se representa el intervalo de cumplimiento de la Ley de Beer, la zona de error fotométrico mínimo, calculada según el método gráfico de Ringbom, así como el valor de la absorptividad molar, desviación típica y error relativo en ambos disolventes, para un nivel de confianza del 95%.

TABLA I

	Disolvente	Intervalo plimiento de la Ley de Beer	Error fotométrico Mínimos M/l	Absortivida M ⁻¹ l cm ⁻¹	'n	'R
1-PrSH	Agua	0,5·10 ⁻⁴ - 1,5·10 ⁻⁴	0,5·10 ⁻⁴ - 1,5·10 ⁻⁴	3.144	±0,011	±1,89
	Formamida	0,25·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	0,5·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	5.065	±0,009	±1,43
2-PrSH	Agua	0,5·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	1·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	2.440	±0,014	±3,47
	Formamida	0,5·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	0,5·10 ⁻⁴ - 2·10 ⁻⁴	3.894	±0,011	±2,71
1-BuSH	Agua	0,5·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	0,5·10 ⁻⁴ - 2,5·10 ⁻⁴	3.102	±0,09	±1,24
	Formamida	0,25·10 ⁻⁴ - 3·10 ⁻⁴	0,75·10 ⁻⁴ - 3·10 ⁻⁴	4.188	±0,012	±1,42

TABLA II

Absorbancia a 500 nm	ml de disolución $5 \cdot 10^{-4}$ M			M/l referido a grupo -SH 10^{-4}
	1-PrSH	2-PrSH	1-BuSH	
0,285	0,6	0,6	0,6	0,9
0,290	0,8	0,2	0,8	0,9
0,278	0,8	0,8	0,2	0,9
0,269	0,2	0,8	0,8	0,9
0,500	1,0	1,0	1,0	1,5
0,532	1,2	0,6	1,2	1,5
0,479	1,2	1,2	0,6	1,5
0,468	0,6	1,2	1,2	1,5
0,500	1,5	-	1,5	1,5

CONCLUSIONES

El estudio de la reacción nitroprusiato grupo -SH en presencia de Zn(II) da lugar a un derivado de coloración violeta que presenta un máximo de absorción a 500 nm., esta reacción puede servir de base para un método espectrofotométrico que permite la determinación de derivados mercaptos de bajo peso molecular (1-propanotiol, 2-propanotiol y 1-butanotiol) ya sea en disolución pura como en disolución conjunta, ya que los radicales orgánicos de cadena corta no parecen interferir en la reacción.

La reacción tiene lugar tanto en disolución acuosa como en disolución de formamida; con este último disolvente se aumenta su sensibilidad debido a su elevada constante dieléctrica que favorece la disolución del radical -SH.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SAGHIR, A.R.; COWAN, J.W.; SALJI, J.P. *Nature*, 211, 87 (1966).
- (2) GHINEA, E.; SIMIONESCU, L.; DIMITRU, V. *Rev. Med. Endocrinol*, 21, 1 (1983).
- (3) JACOBSEN, J.V.; BERNHARD, R.A.; MANN, L.K.; SAGHIR, A.R. *Archives of biochemistry and Biophysics*, 104, 437 (1964).
- (4) VERMA, B. Ch.; KUMAR, S.; SHARMA, V.J. *Indian Chem. Soc.*, 55, 626 (1978).
- (5) KNIGHT, A.R.; VERMA, A. *Ind. Eng., Chem. Prod. Res. Dev.*, 18 (1979).
- (6) SINGH, L.N.; *Indian J. Exp. Biol.*, 18, 1.307 (1980).
- (7) DUBOIS, P.; LEVILLAIN, P.; VIEL, C. *Talanta*, 28, 843 (1981).
- (8) SHANKARANARAYANA, M.L.; ABRAHAM, K.O.; RAGHAVAN, C.P. *Indian Food Packer*, 35, 3 (1984).
- (9) ABD EL-KADER, A.K.; AHMED, Y.Z.; ABD EL-MOTTALB, M. *Anal. Lett.*, 17 (A19). 2.259 (1984).
- (10) TUMMURU, M.K.; DIVAKAR, T.E.; SASTRY, Ch. S. *Analyst*, 109, 1.105 (1984).

- (11) TAKAHASHI, S.; KOKUBO, M.; SATAKE, K. *Chemistry Letters*, 1.445 (1983).
- (12) HUNSAKER, Jr. D.B.; SCHENK, G.H. *Talanta*, 30, 475 (1983).
- (13) CAPUTO, R.; FERRERI, C.; MARINO, G.; PALUMBO, G.; SANNIA, G.J. *Protein. Chem.* 4 (2), 133 (1985).
- (14) BURRIEL, M.F.; LUCENA CONDE, F.; Arribas Jimeno, S.; HERNANDEZ MENDEZ, J. *Química Analítica Cualitativa*, Ed. Paraninfo (1983).
- (15) KORTE, F.; VOGEL, J. J. *Chromatog.*, 9, 381-385 (1962).