

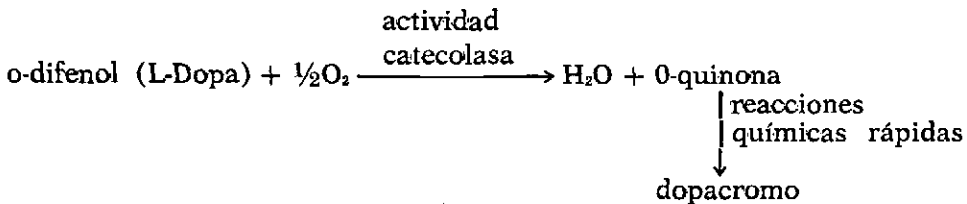
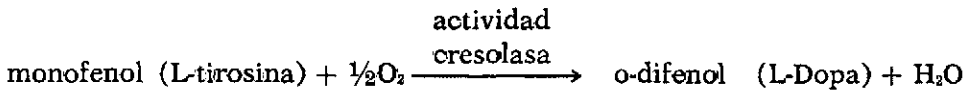
Discusión y mejora del método espectrofotométrico de medida de la oxidación de L-tirosina por tirosinasa

POR

J. Cabanes, F. García-Carmona,
F. García-Cánovas y J. A. Lozano

INTRODUCCION

Tirosinasa (E. C. 1.14.18.1) es una cuproproteína que cataliza las dos reacciones enzimáticas siguientes:



El dopacromo posee un máximo de absorción a 475 nm, por lo que la absorción a esta longitud de onda se ha utilizado para medir la actividad «catecolasa» del enzima, usando L-dopa como sustrato. Sin embargo, no sería, en principio, un buen procedimiento para la cuantificación de la actividad «cresolasa» usando un monofenol como L-tirosina como sustrato, pues el dopacromo formado se debería a la acción secuencial de las dos actividades enzimáticas. Por ello para la medida de la actividad cre-



solasa, se han buscado técnicas radiométricas (1, 2) o técnicas espectrofotométricas utilizando otros sustratos menos fisiológicos (3, 4).

Diversos investigadores han demostrado, sin embargo, que cuando se usa L-tirosina como sustrato, el L-dopa, producto de la acción cresolasa del enzima, queda ligado al mismo, sin liberarse al medio de reacción, por lo cual queda sometido inmediatamente a la acción catecolasa del enzima (5-7), transformándose en dopacromo vía la o-quinona correspondiente. Utilizando este criterio, varios autores (7-9) han utilizado los incrementos de absorbancia a 475 nm como medida de actividad cresolasa cuando el sustrato es la L-tirosina.

Por otra parte, las diversas casas comerciales que han normalizado la medida de la actividad cresolasa, referida, sobre todo, a la preparación enzimática comercial procedente de champiñón, han utilizado como método de medida el incremento de absorbancia a 280 nm. Otros autores (10-12) miden la actividad cresolasa a 280 nm, basándose en la conversión de L-tirosina en L-dopa.

Nosotros proponemos seguir el cambio de absorbancia a 302 nm como una medida más precisa y sensible de la actividad cresolasa del enzima, presentando otras varias ventajas sobre los métodos hasta ahora utilizados, tal como se discutirá posteriormente.

MATERIALES Y METODOS

El enzima tirosinasa se obtuvo de epidermis de rana esculenta ridibunda entre los meses de noviembre a marzo. La extracción y purificación de proenzima, así como la activación de éste, utilizando tripsina unida a Sepharosa 4B-CNBr se ha descrito previamente (13). Tirosinasa de hongo y tirosina se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

La medida de la actividad se efectuó a 25° C, en un medio de tampón fosfato 0,01 M pH = 7,0 conteniendo L-tirosina 1 mM, iniciándose la reacción por la adición de aproximadamente 15 mU. de enzima. Una unidad de enzima cataliza la transformación de 1 µml de sustrato por minuto.

Los espectros se registraron de forma automática en un espectrofotómetro DW2-Aminco.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se recogen las longitudes de onda que corresponden a los máximos de absorción espectrofotométricas de las diferentes sustancias implicadas en la conversión de L-tirosina a dopacromo.

Los registros espectrofotométricos, a diferentes tiempos, de la transformación de L-tirosina (0,5 mM) catalizada por la enzima tirosinasa de epidermis de rana, se muestran en la figura 1. Se puede observar la presencia de dos máximos de absorción, uno en la región visible a 475 nm, y otro en la ultravioleta a 302 nm., siendo estos máximos los característicos del dopacromo, cuando se aisló a partir de la oxidación de L-dopa (14).

Los espectros están de acuerdo con dos tipos de observaciones conocidas previamente. En primer lugar, que en la oxidación de L-dopa por tirosinasa de champiñón (15) al realizar el análisis matricial de los espectros, no fue posible detectar la aparición de o-dopaquinona ni de leucodopacromo, intermedios de la oxidación a pH = 7,0; en segundo lugar, que los pasos químicos entre o-dopaquinona y leucodopacromo correspondientes a su desprotonación ciclación a leucodopacromo y oxidación del leucodopacromo por otra molécula de o-dopaquinona, respectivamente, como se muestra en la fig. 2 (16), sean tan rápidos que impliquen una acumulación de intermedios despreciable. Esto ocurre a pH 6,5-7, donde la constante de transición de todas estas reacciones es superior a 0,14 seg^{-1} (17). Así pues, L-dopa aparece en el medio de reacción según muestra el esquema de la fig. 2, descartándose la posibilidad de que el L-dopa sea liberado directamente por el enzima (18).

El espectro mostrado en la fig. 1 manifiesta un ligero hombro a 284 nm, el cual se puede asignar a la presencia de L-dopa ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$). En los espectros mostrados en la fig. 3 se han repetido en la zona del ultravioleta, los mismos registros de la fig. 1, colocando en la cubeta de referencia L-tirosina (0,5 Mm); los resultados muestran la sola presencia de ese máximo a 278 nm en un primer registro, lo que evidentemente está de acuerdo con la interpretación de la acumulación de L-dopa según la fig. 2; ahora bien, esta acumulación es constante porque el sistema llega al estado estacionario, ya que L-dopa se ve sometido a la actividad catecolasa del enzima.

En la fig. 4 se muestran comparativamente los registros de actividad enzimática a 475 nm y 302 nm. En ambos casos existe el mismo «período de retardo» característico de la actividad cresolasa de tirosinasa (1, 3-9, 19), pero la absorbancia a 302 nm fue 2,6 veces mayor que a la de 475 nm, con un coeficiente de extinción $\epsilon_{302} = 9360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor semejante al calculado para el dopacromo a partir de la oxidación desde L-dopa (14). Por ello pensamos que la medida a 302 nm de la actividad cresolasa de tirosinasa presenta claras ventajas sobre la determinación a 475 nm, que ha sido utilizada por diversos autores (7-9).

Por otra parte, tal como se muestra en la tabla 2, diversas casas comerciales que suministran tirosinasa de champiñón, recomiendan medir

la actividad cresolasa a 280 nm por extrapolación de una técnica que se desarrolló primitivamente para medir la oxidación de tirosinas no N-terminales de olipépticos (20), o de proteínas (21), casos en los que estaba claramente impedida su ciclación hasta dopacromo, al estar bloqueado el grupo $-\text{NH}_2$ de la tirosina; sin embargo, cuando se utiliza L-tirosina soluble, se produce la ciclación y conversión en dopacromo. Esta extrapolación ha llevado a algunos autores (10-12) a utilizar el incremento de absorción a 280 nm, como evaluación del paso de L-tirosina a L-dopa, usando un coeficiente de extinción de $1.440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ahora bien, tal como se observa en la fig. 3, no se produce ningún máximo a 280 nm, sino que la absorción a esa longitud de onda corresponde a la cola del verdadero máximo a 302 nm asignable al dopacromo, por lo cual creemos debe subsanarse en el futuro esta confusión.

Los mismos resultados obtenidos con tirosinasa de epidermis de rana se han reproducido cuando se ha utilizado como fuente del enzima tirosinasa de champiñón.

RESUMEN

Se discuten las diferentes técnicas espectrofotométricas que se utilizan para la medida de la actividad cresolasa de tirosinasa, utilizando L-tirosina como sustrato. Entre estas técnicas están incluidas las utilizadas por diferentes investigadores como la recomendada por las casas comerciales.

Mediante el estudio espectrofotométrico del transcurso de la reacción de oxidación de L-tirosina, se propone la utilización de los incrementos de absorción a 302 nm con un $\epsilon = 9360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como forma más sensible, precisa y real de medir la oxidación de L-tirosina a dopacromo, ya que ningún intermedio del sistema de reacción se acumula significativamente con el tiempo de reacción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha subvencionado en parte por un proyecto de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

TABLA 1

LONGITUDES DE ONDA DE LOS MAXIMOS DE ABSORCION DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS INVOLUCRADOS EN LA CONVERSION DE L-TIROSINA A DOPACROMO, A pH = 7,0

<i>Compuesto</i>	λ_{max} pH = 7,0	<i>Referencia</i>
Dopa	278	(15)
Dopaquinona	395	(15)
Leucodopacromo	296	(15)
Dopaquinona NH ₂ -bloqueada	275,390	(21)
Dopacromo	302,473	(15)

TABLA 2

CASAS COMERCIALES QUE RECOMIENDAN LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CRESOLASA A 280 NM

<i>Casa Comercial</i>	<i>Procedimiento</i>	<i>Definición de unidad</i>
Worthington	Tampón fosfato	Una unidad de enzima es aque-
Sigma	pH = 6,5	lla cantidad que produce un
P. L. Biochemicals	1 mM L-tirosina	incremento de 0,001 unidad de
Mile Research Products	25° C	absorción por min. a 280 nm.
INC Nutritional Biochemical		
Koch-Light		
SERVA		



BIBLIOGRAFIA

1. POMERANTZ, S. H. (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 161-168.
2. NAGASU, T.; LEWITT, M., y UNDEFRIEND, S. (1964), *Anal. Biochem.*, 9, 122-126.
3. KEYES, M. H., y SEMERSKY, F. E. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 148, 256-261.
4. GARCÍA-CARMONA, F.; PEDREÑO, E.; GALINDO, J. D.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. (1979), *Anal. Biochem.*, 95,, 433-435.
5. KIM, K. H., y TCHEN, T. T. (1962), *Biochem. Biophys. Acta*, 59, 569-576.
6. OIKAWA, A.; NAKAGASU, M.; NOHARA, M., y TCHEN, T. T. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 148, 548-557.
7. POMERANTZ, S. H., y MURTHY, V. V. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 73-82.
8. PAU, R. M., y KELLY, C. (1975), *Biochem. J.*, 147, 565-573.
9. CSUKÁS-SZATLOCZKY, I., y PARÁDI, E. (1972), *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 23, 107-113.
10. DUCKWORTH, H. W., y COLEMAN, J. E. (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 1613-1625.
11. ROBB, D. A. (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 131-132.
12. MIKKELSEN, R. B., y TRIPLETT, E. L. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 638-643
13. LOZANO, J. A.; MONTSERRAT, F.; GALINDO, J. D., y PEDREÑO, E. (1975), *Rev. esp. Fisiol.*, 31, 21-28.
14. GRAHAM, D. G.; TIFFANY, S. M., y VOGEL, F. S. (1978), *J. Invest. Dermatol.*, 70, 113-116.
15. GRAHAM, D. G.; JEFFS, P. W. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 5729-5734.
16. GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; VERA, J.; IBORRA, J. L., y LOZANO, J. A. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257 8738-8744.
17. GARCÍA-CARMONA, F.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; IBORRA, J. L., y LOZANO, J. A. (1982), *Biochem. Biophys. Acta*, 717, 124-131.
18. CABANES, J. (1982), «Tesina de Licenciatura», Universidad de Murcia.
19. GARCÍA-CARMONA, F.; GARCÍA-CÁNOVAS, F., y LOZANO, J. A. (1980), *Int. J. Biochem.*, 11, 325-327.
20. YASUNOBU, K. T.; PETERSON, E. W., y MASON, H. S. (1959), *J. Biol. Chem.*, 234, 3291-3295.
21. CORY, J. G., y FRIEDEN, E. (1967), *Biochemistry*, 6, 116-120.

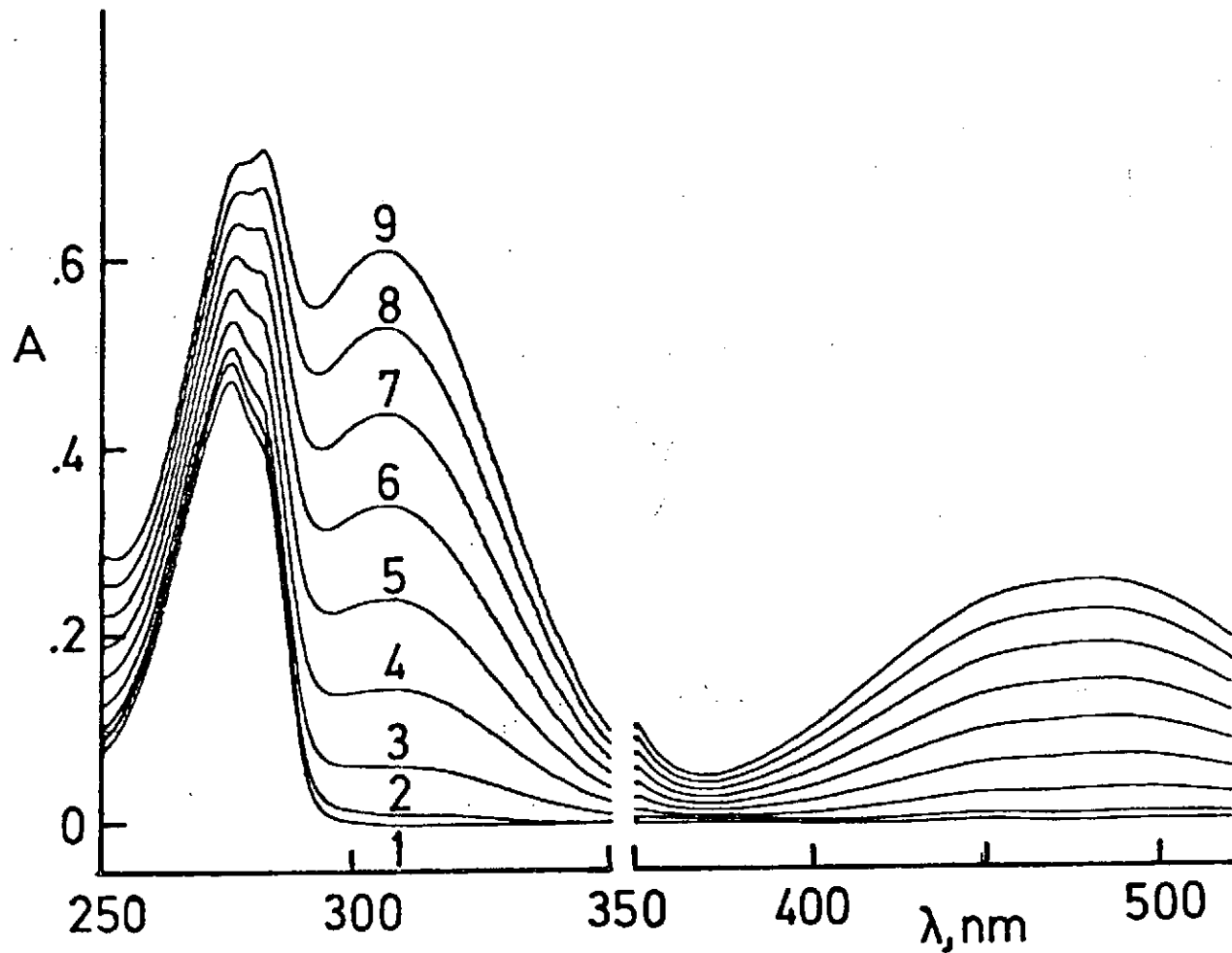


FIGURA 1.—Registros espectrofotométricos de la oxidación de L-tirosina (0,5 mM) a diferentes tiempos, después de añadir 15 mU de enzima, el registro se hace en dos ensayos de 250-350 nm y de 350-520 nm, a los $t = 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700$ y 800 segundos.

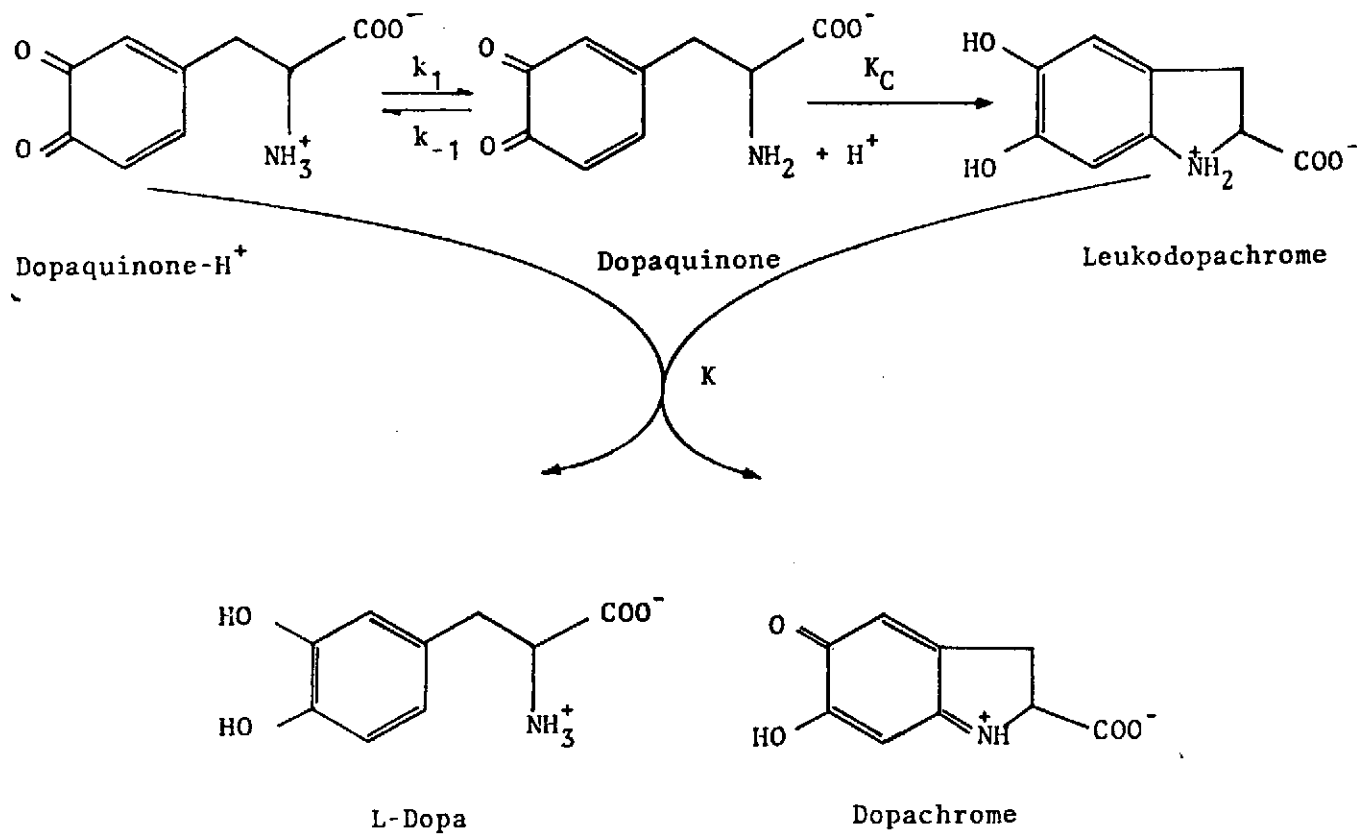


FIGURA 2.—Esquema de reacciones químicas que ocurren desde dopaquinona a dopacromo.

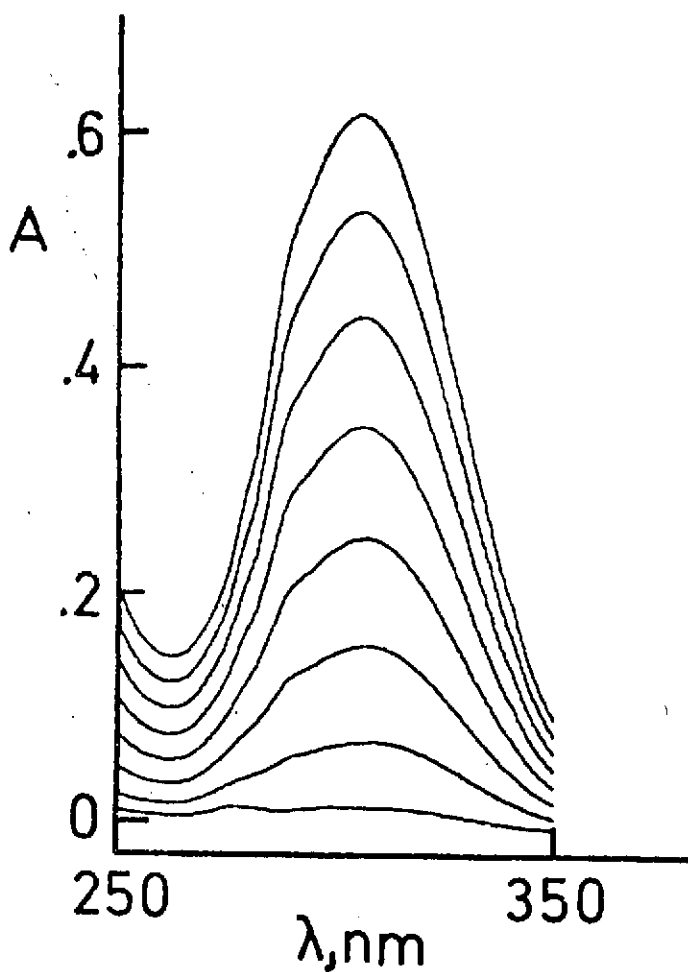


FIGURA 3.—Registros espectrofotométricos de la oxidación de L-tirosina (0,5 mM) a diferentes tiempos, después de añadir 15 mU de enzima, el registro se hace poniendo en la cubeta de referencia L-tirosina (0,5 mM) a $t = 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700$ y 800 segundos.

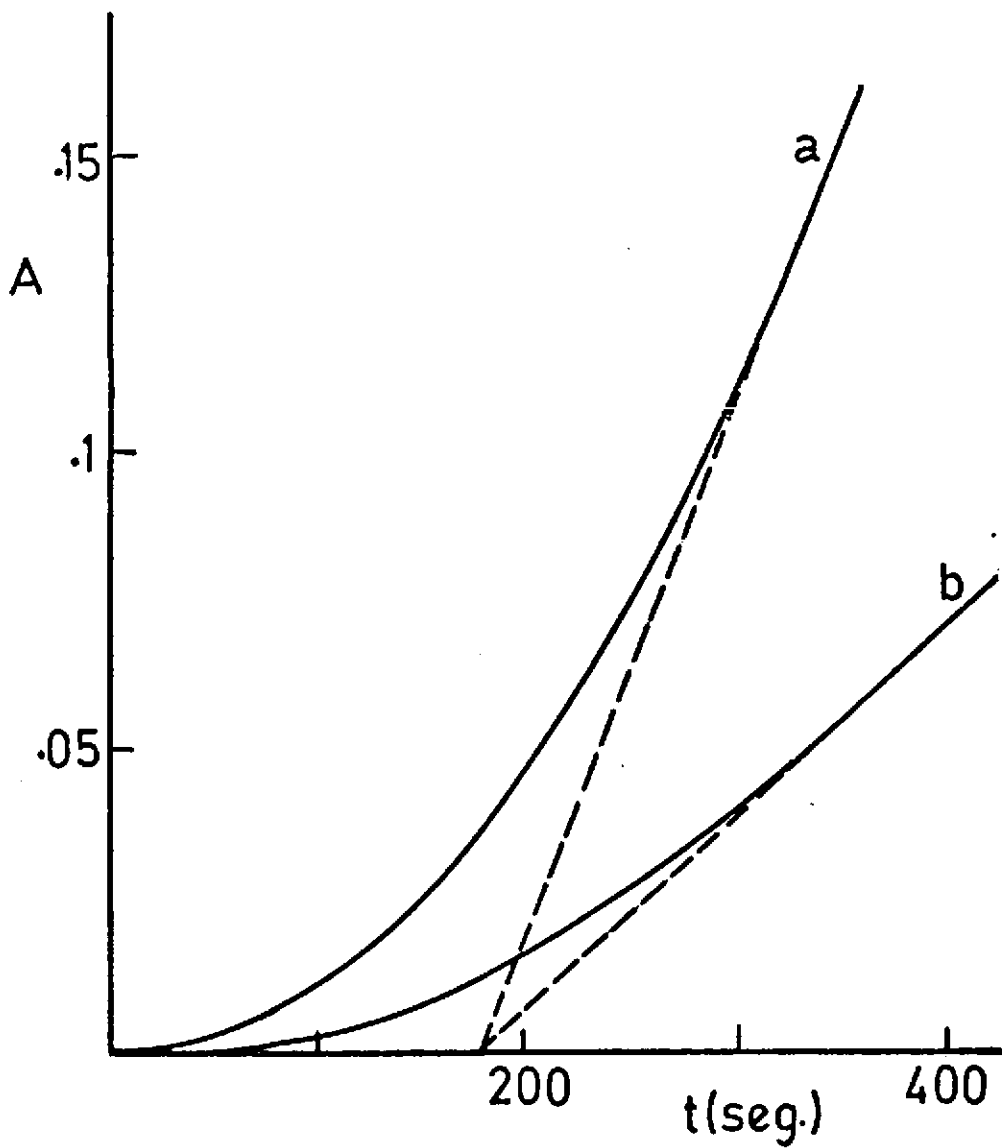


FIGURA 4.—Registros de actividad cresolasa a 302 y 475 nm, L-tirosina (1 mM) en en tampón fosfato 0,01 M pH = 7,0 y 15 mU de enzima.

Determinación espectrofotométrica y espectrofluorimétrica de oro por un proceso de extracción

Determinación de oro en plomos

POR

C. Sánchez-Pedreño, M. Hernández
Córdoba e I. López García

SUMMARY

Tetrachloroauric acid forms with phenosafranine (C. I. 50200) an ion-pair which is extractable in butyl acetate. As a consequence new spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for gold determination are developed. With 5 ml of organic layer and 25 ml for the aqueous phase, 0,3 M in hydrochloric acid, 2,0 M in sodium chloride and 10^{-4} M in phenosafranine, Beer's law is obeyed at 527 nm in the range 1,25-37,5 micrograms of gold. The sensitivity can be enhanced measuring the fluorescence ($\lambda_{exc} = 521$, $\lambda_{em} 547$ nm) of the organic phase diluted five times with acetone and even 0,125 μ g of gold can be determined. The methods have been applied to the determination of gold (2-10 p.p.m.) in lead with good analytical results.

RESUMEN

El anión tetracloroaurato forma con la fenosafranina (I. C. 50200) un compuesto de asociación iónica extraíble en acetato de butilo; lo que nos ha permitido proponer nuevos métodos, espectrofotométrico y espectrofluorimétrico, para la determinación de oro. Para 5 ml de fase orgánica y 25 ml de fase acuosa, en medio 0,3 M en HCl, 2,0 M en NaCl y 10^{-4} M en fenosafranina la ley de Beer se cumple entre 1,25 y 37,5 μ g de oro a 527 nm.



La sensibilidad puede aumentarse midiendo la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 521$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 547$ nm) de la capa orgánica diluida cinco veces con acetona, pudiendo determinarse de esta manera incluso $0,125 \mu\text{g}$ de oro. Los métodos han sido aplicados a la determinación de oro (2-10 p.p.m.) en plomo con excelentes resultados analíticos.

INTRODUCCION

Dado el gran interés que presenta el análisis de oro en minerales y muestras metálicas diversas, en las que usualmente el contenido en el metal es muy bajo, el problema ha sido ampliamente abordado en la bibliografía analítica, tanto con aplicación de métodos clásicos como instrumentales (1-5). Un grupo reciente y atractivo de métodos para la determinación de oro hacen uso de la formación y extracción en disolventes orgánicos de compuestos de asociación iónica entre complejos aniónicos de Au(III) con cationes orgánicos voluminosos y determinación de la especie extraída con una técnica analítica adecuada según las características del par iónico formado. Dentro de esta línea se encuentran los dos métodos, que presentamos en este trabajo, que se basan en la formación y extracción en acetato de butilo del compuesto tetracloroaurato de fenosafranina y subsiguiente determinación espectrofotométrica o espectrofluorimétrica del oro.

En la bibliografía se encuentran varios procedimientos en los que se analiza oro a través de la formación de este tipo de compuestos, habiendo sido el anión cloruro el ligando más utilizado para la formación del complejo de adición con Au(III). Como cationes orgánicos se han empleado principalmente diversos derivados del trifenil metano (6-11), del xanteno (12-13), tiazinas (14), oxazinas (15) y derivados de la acridina (16). En la amplia revisión bibliográfica efectuada no hemos encontrado ninguna referencia sobre la utilización de colorantes fenazínicos para la formación de complejos de asociación iónica con Au(III). Dentro precisamente de este grupo de colorantes se encuentra la fenosafranina utilizada en este trabajo, y que se ha seleccionado por sus excelentes características absorbentes en el visible (elevada absorptividad molar) y fluorescentes (elevado rendimiento cuántico), lo que permite hacer uso para la determinación del metal de las dos técnicas ópticas mencionadas. Los métodos que se proponen, muy sensibles y selectivos, han sido aplicados con excelentes resultados analíticos para el análisis de oro en plomos de fundición que contienen cantidades variables y muy pequeñas del metal, desde 2 a 10 gramos/tonelada.

PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS

Espectrofotómetro Pye Unicam SP 8-100 y SP 1900 (absorción atómica).

Espectrofluorímetro Perkin-Elmer 3000 acoplado a registrador XY057.

Disolución de Au (III) de 1.000 ppm.—Se preparan disolviendo la cantidad necesaria de la especie $H(AuCl_4) \cdot 3H_2O$ con unas gotas de HCl concentrado añadiendo seguidamente el volumen de agua necesario para el enrase en matraz aforado. Se contrasta según (17).

Disolución de feno-safranina 10^{-3} M.—Preparada por pesada de 0,0645 g del producto 3,7-diamino-5-fenilfenazinio (I.C. 50 200) y diluyendo con agua bidestilada a 200 ml.

Otras disoluciones más diluidas de Au (III) y feno-safranina se preparan por diluciones exactas y convenientes de las anteriores.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ORO

En embudos de decantación de 100 ml se miden volúmenes de la muestra de Au(III) que contengan desde 1,25 a 37 μ g. Se añaden 10,0 ml de disolución NaCl 5 M, 2,5 ml de HCl 3 M y 2,5 ml de feno-safranina 10^{-3} M. Se completa con agua bidestilada hasta 25 ml. Se agita y a continuación se añaden 5,0 ml de acetato de butilo y se agita durante 2-3 minutos. Tras dejar reposar las fases unos minutos se despreja la fracción acuosa y se centrifuga la orgánica con el objeto de eliminar la ligera turbidez debida a las pequeñas gotas de agua que pueden permanecer en suspensión. Se mide la absorbancia a 527 nm utilizando como referencia otra muestra sometida al mismo tratamiento pero que no contiene Au (III).

La recta de calibrado se prepara usando diferentes volúmenes de la disolución patrón de Au(III) tratada de la misma manera.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE ORO.

Un volumen de muestra conteniendo entre 0,125 y 3,75 μ g de oro se sitúa en un embudo de decantación. Se le añade 2,5 ml de HCl 3 M, 10 ml de NaCl 5 M y 2,5 ml de feno-safranina $5,10^{-4}$ M completándose a 25 ml con agua bidestilada. Se trata con 5 ml de acetato de butilo y se agita durante 2-3 minutos. Se dejan separar las fases y se trasvasa la orgánica a un tubo cónico donde se centrifuga. Se toman 2 ml de esta disolución y se llevan a 10 ml con acetona. Se excita a 521 y se mide la fluorescencia del extracto a 547 nm. El ajuste de cero del instrumento se hace con una muestra sometida al mismo tratamiento pero exenta de Au(III).

DETERMINACIÓN DE ORO EN PLOMOS

Se pesan exactamente cantidades de plomo de fundición comprendidas entre 0,1-0,5 g, que se disuelven en ácido nítrico 6 N. Se deja enfriar y se añade 10 ml de disolución de NaCl 3 M, se deja que precipite el $PbCl_2$ y se filtra. El filtrado se diluye hasta aproximadamente 50 ml y se lleva a embudo de decantación de 100 ml. Se añaden 10 ml de éter etílico saturado con agua y se agita. Se separa la fase

acuosa y se repite la operación del éter etílico por dos veces. Se desprecia la fase acuosa y se mezclan las porciones de fase orgánica. Se elimina el éter y se añade a la muestra 25 ml de HCl 0,6M. Se toman volúmenes de esta disolución que se someten al procedimiento operatorio descrito.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como es conocido, el Au(III) forma complejos de adición con diversos ligandos inorgánicos, entre ellos con halogenuros y con pseudohalogenuros. Dado que el ácido clorhídrico, junto con el nítrico, son los ácidos usualmente utilizados como disolventes de minerales y otras muestras de oro, por lo que en las disoluciones resultantes el Au(III) se encuentra como $(\text{AuCl}_4)^-$, seleccionamos al ligando Cl^- para la formación del complejo de adición que constituye la parte aniónica del par iónico. Como parte positiva del compuesto, se eligió la fenosafranina que en el medio ácido a que se procede se encuentra en su forma monoprotonada y pues es un catión univalente y voluminoso con excelentes características absorbentes en la región espectral visible y fluorescente, ya mencionadas.

En efecto, hemos comprobado que cuando a una disolución clorhídrica que contiene Au(III) aún en muy pequeña cantidad se le adiciona fenosafranina y se extrae con un disolvente orgánico, como benceno, ciclohexanona, acetato de butilo, entre otros, al separar las fases, la orgánica queda de color rosa intenso debido a que en la misma se ha disuelto el compuesto $(\text{AuCl}_4)^-$ -fenosafranina⁺. Tales hechos se comprueban en las gráficas de las figuras 1 y 2. La curva 1 de la figura 1 se ha obtenido cuando una disolución que contiene 25 μg de Au(III) en medio 2 M en NaCl, 0,3 M en HCl y 10^{-4} M en fenosafranina, en un volumen final de 25 ml, se agita con 5 ml de acetato de butilo y con el extracto orgánico se efectúa el barrido espectral. Se observan dos máximos de absorción, uno a 527 nm, que corresponde al de la fenosafranina en acetato de butilo, y otro a 322 nm, debido a la especie $(\text{AuCl}_4)^-$. La curva 2 de la figura 1 se refiere al espectro de una disolución preparada de igual forma pero que no contiene Au(III).

Puede comprobarse que en este disolvente existe una marcada diferencia entre las absorbancias a 527 nm de la muestra que contiene Au(III), y pues se ha extraído el $(\text{AuCl}_4)^-$ -fenosafranina⁺ (curva 1) y la del blanco en la que la especie es Cl^- -fenosafranina⁺, cuya extracción es muy pequeña (curva 2).

Por otra parte, es destacable la gran diferencia que existe entre los valores de A, en sus máximos de absorción respectivos, de las especies $(\text{AuCl}_4)^-$ -fenosafranina⁺ y $(\text{AuCl}_4)^-$ -H⁺, lo que señala que la sensibilidad

del método espectrofotométrico con el empleo de feno-safranina que aquí se propone es muy superior a la que presenta la aplicación de la especie $(\text{AuCl}_4)^-\text{H}^+$ para la misma finalidad.

La figura 2 representa los espectros de emisión y excitación de extractos en acetato de butilo-acetona obtenidos cuando 25 ml de disoluciones acuosas, que contienen 0,3 (curva 2) y 3,0 μg de Au(III) (curva 1) y que son 2 M en NaCl, 0,3 M en HCl y $5 \cdot 10^{-5}$ M en feno-safranina, se extraen con 5 ml de acetato de butilo y el extracto es diluido cinco veces con acetona. La curva 3 se refiere a una disolución preparada de igual forma pero que no contiene Au(III). Se observa que el espectro de excitación presenta un máximo a 521 nm y el de emisión uno a 547 nm, ambos pertenecientes a la forma monoprotonada de la feno-safranina en este disolvente. Se señalan las mismas diferencias entre las intensidades de fluorescencia para las muestras que contienen Au(III), frente al blanco, como en el caso precedente. Seguidamente se estudian las principales variables que afectan la formación y extracción del par iónico $(\text{AuCl}_4)^-\text{feno-safranina}^+$, con vistas a proponer dos nuevos métodos, espectrofotométrico y espectrofluorimétrico para la determinación de oro.

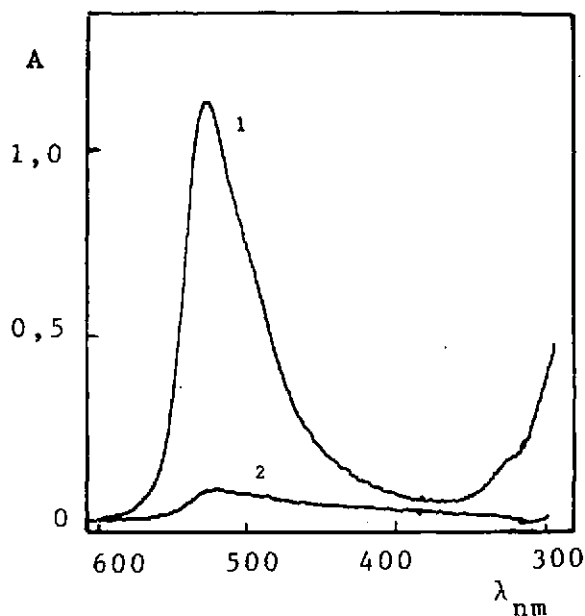


FIGURA 1.—Espectros de absorción en el visible: curva 1: en presencia de 25 μg de Au(III); curva 2: en ausencia de Au(III).

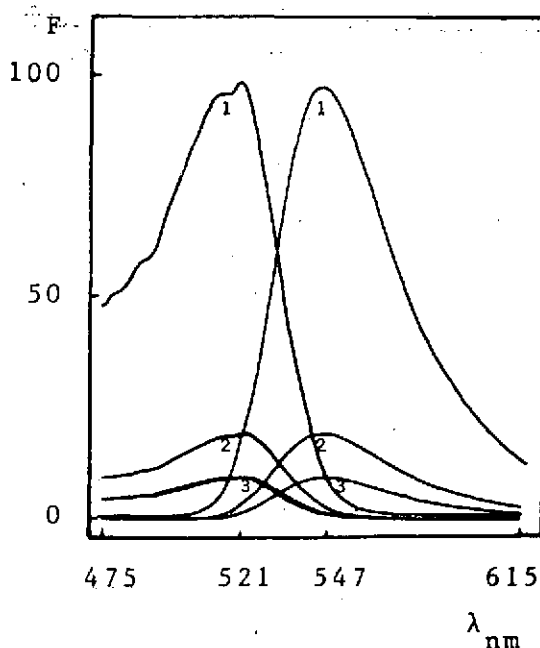


FIGURA 2.—Espectros de excitación corregido y emisión: curva 1: en presencia de 3 μg de Au (III); curva 2: en presencia de 0,3 μg de Au (III); curva 3: en ausencia de Au (III).

INFLUENCIA DE LA ACIDEZ

El efecto de la acidez se ha estudiado tanto por vía espectrofotométrica como espectrofluorimétrica. En el primer caso, por extracción con 5 ml en acetato de butilo de una serie de disoluciones acuosas conteniendo todas ellas 10 μg de Au(III), fenosafranina 10^{-4} M y distintas concentraciones de HCl desde 0,01 a 2,0 M. Con objeto de eliminar la influencia de la concentración de Cl^- variable aportada por el HCl, a todas las muestras de la serie se les añadió disolución de NaCl suficiente para que, junto con la del HCl, el medio resultase 2 M en Cl^- . El volumen final de la fase acuosa es 25 ml. Para el estudio de la acidez por medidas de fluorescencia las disoluciones acuosas contenían en 25 ml, 1 μg de Au(III), fenosafranina $5 \cdot 10^{-5}$ M y la concentración en HCl se hizo variar entre 0,01 a 2 M, siguiéndose el mismo criterio para la $[\text{Cl}^-]$ que en el caso precedente. Como extractante se usó 5 ml de acetato de butilo y posterior dilución del extracto cinco veces con acetona. Los blancos en ambos casos corresponden a muestras preparadas de igual forma, pero que no contienen Au(III). Los resultados obtenidos quedan reflejados en las figuras 3

y 4. Se observa que se obtienen valores máximos y constantes de A o de I_f para concentraciones en HCl entre 0,02-0,6 M. Se ha seleccionado un medio 0,3 M en HCl.

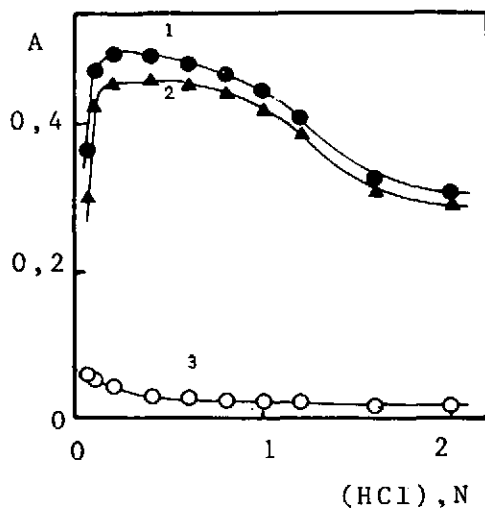


FIGURA 3.—Influencia de la acidez en el procedimiento espectrofotométrico: curva 1: en presencia de 10 µg de Au(III); curva 2: resultante; curva 3: en ausencia de Au(III).

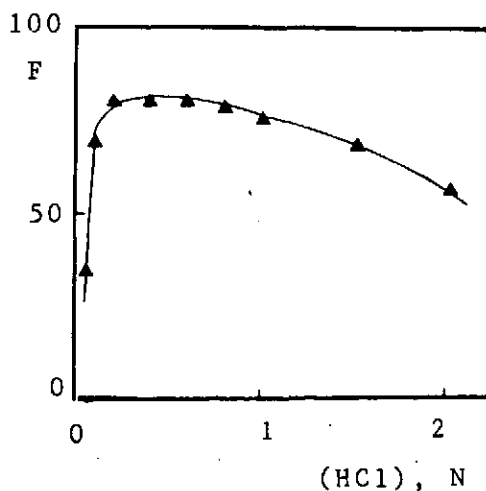


FIGURA 4.—Influencia de la acidez en la señal de fluorescencia.

INFLUENCIA DEL EXTRACTANTE ORGÁNICO

Se efectuó un amplio estudio con el uso de gran número de disolventes orgánicos de distintas constantes dieléctricas para encontrar aquellos en los que fuese máxima la extracción del par iónico tetracloroaurato de fenosafranina y muy pequeña o a ser posible casi nula, la del blanco, es decir, la de cloruro de fenosafranina.

En una primera revisión encontramos que los disolventes que aportaban el grupo funcional éster, como los acetatos de etilo, butilo, isoamilo, etc., proporcionaban excelentes extracciones del compuesto de asociación iónica que nos ocupa y, además, era mayor la diferencia entre la extracción del $(\text{AuCl}_4)^-$ -fenosafranina⁺ y la del Cl^- -fenosafranina⁺, que cuando se empleaban disolventes con otros grupos funcionales, hidróxilo, carbónilo, ácido, etc., o disolventes aromáticos, como benceno y tolueno. A la vista de estos resultados se seleccionaron los ésteres orgánicos, acetato de etilo, butilo e isoamilo.

La figura 5 representa los espectros de absorción de los extractos orgánicos en acetato de isoamilo (curva 1) en acetato de butilo (curva 2) y de etilo (curva 3), obtenidos cuando disoluciones de 10 ml de fase acuosa que contienen 25 μg de Au(III), HCl 0,3 M, NaCl 2 M y fenosafranina 10^{-4} M se extraen con 5 ml de cada uno de los disolventes citados. Se observa que cuando se utilizan el acetato de isoamilo o el de butilo las extracciones del blanco son muy pequeñas, siendo mayor la extracción cuando se utiliza el acetato de etilo. Como la absorbancia en acetato de butilo de la especie $(\text{AuCl}_4)^-$ -fenosafranina⁺ es ligeramente superior a la que suministra igual cantidad de oro en acetato de isoamilo, como se aprecia en las curvas 1 y 2, seleccionamos como disolvente orgánico más adecuado el acetato de butilo. Resultados similares se obtuvieron cuando se aplicó la técnica espectrofluorimétrica.

Para encontrar la relación óptima de volumen de fase acuosa a orgánica se realizó un estudio que permitió comprobar que al menos hasta la relación $V_a/V_o = 10/1$, máxima ensayada, las extracciones eran prácticamente del 100 % y se cumple la ley de Beer. Para mayor comodidad en el procedimiento operatorio y menor tiempo en la separación de las fases se eligió la relación $V_a/V_o = 5$, traducida en operar con volúmenes de disolución acuosa de 25 ml y 5 de acetato de butilo.

En las medidas de fluorescencia los extractos en acetato de butilo se diluyen cinco veces con acetona antes de proceder a las medidas de fluorescencia.

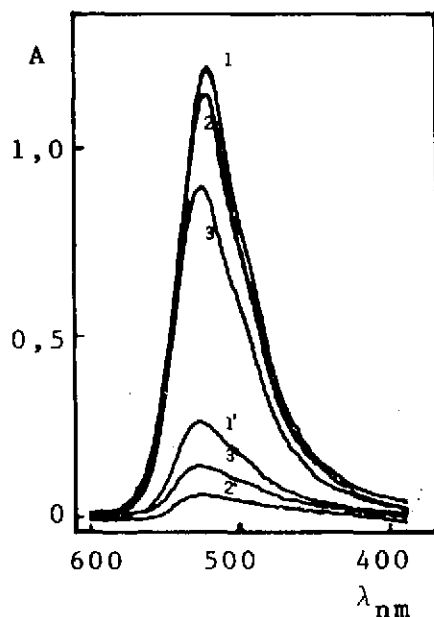


FIGURA 5.—Elección del extractante adecuado: curva 1: acetato de etilo; curva 2: acetato de butilo; curva 3: acetato de isoamilo; 1', 2', 3' hacen referencia a los respectivos espectros en ausencia de Au(III).

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO

La concentración del ligando complejante Cl^- es una variable importante, ya que debe asegurar la transformación previa del Au(III) en su complejo (AuCl_4^-), por lo tanto, debe haber un exceso suficiente de Cl^- respecto a la cantidad de Au(III). No es probable la formación de complejos clorurados de oro de índice de coordinación superior. La figura 6 señala los resultados obtenidos, cuando muestras que contienen 16 μg de Au(III) en 25 ml, en medio H_2SO_4 0,3 N, y fenosafranina 10^{-4} M se les adiciona distintas concentraciones de NaCl. Las muestras se extraen con 5 ml de acetato de butilo y los extractos se miden a 527 nm (curva 1). Se observa que se alcanza la máxima formación y extracción del (AuCl_4^-)-fenosafranina⁺ para $[\text{Cl}^-] > 0,1$ M, permaneciendo ya la absorbancia constante hasta los altos valores de $[\text{Cl}^-]$ ensayados y que quedan representados en la gráfica.

Dentro del intervalo de concentraciones de Cl^- óptimas nos decidimos por una concentración alta, que, como acabamos de mostrar, conduce a los mismos valores de A, pero que por el conocido efecto «salting out»

(provocado por una elevada concentración salina), se favorece el proceso de extracción del par iónico, lo que se traduce en una rápida separación de las fases. La concentración seleccionada ha sido 2,3 M en Cl^- , aportada por la correspondiente al HCl 0,3 M y a NaCl 2 M.

Las absorbancias de los blancos, preparados de forma similar pero en ausencia de Au(III), se han representado en la gráfica 2 de la misma figura y permite observar que se alcanzan valores muy bajos de A en un amplio intervalo de $[\text{Cl}^-]$.

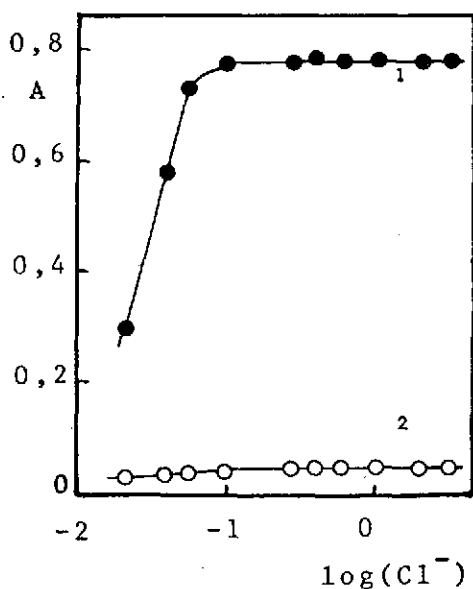


FIGURA 6.—Influencia de la concentración de cloruro: curva 1: en presencia de 16 μg de Au(III); curva 2: en ausencia de Au(III).

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOSAFRANINA

Para estudiar la influencia de la concentración de colorante se prepararon una serie de muestras de 25 ml que contenían 10 μg de Au(III) y eran 0,3 M en HCl, 2 M en NaCl y a las que se adicionaron distintos volúmenes de disolución de fenosafranina 10^{-3} M, de forma que su concentración se encontrase entre los límites 10^{-5} a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Las muestras se agitaron con 5 ml de acetato de butilo. Las absorbancias de los extractos a 527 nm se representan en la figura 7, medidas frente a blancos preparados de igual forma pero sin Au(III).

Se observa que a partir de [fenosafranina] $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M (relación molar [fenosafranina]/[Au(III)] ≥ 5) se obtienen valores constantes y máximos de A. Se ha seleccionado una concentración 10^{-4} M.

En las medidas de fluorescencia, dado que se procede con concentraciones de Au(III) menores, puede disminuirse la cantidad de fenosafranina. Hemos comprobado, procediendo de igual forma que en el caso precedente, que resulta adecuada una concentración de colorante de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

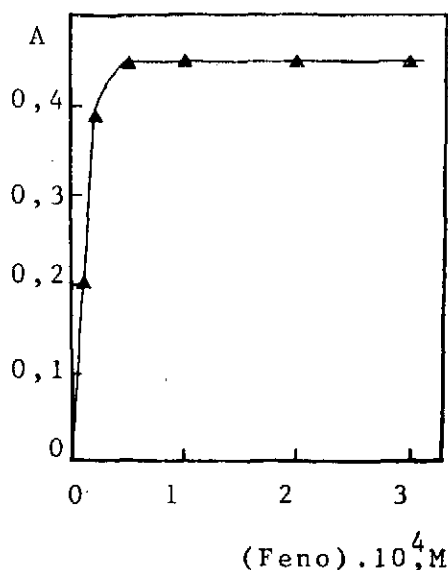


FIGURA 7.—Influencia de la concentración de fenosafranina en la extracción de 10 µg de Au(III).

ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPUESTO EXTRAÍDO

Para establecer la estequiometría del complejo de asociación iónica extraído en acetato de butilo se ha aplicado el método de las variaciones continuas (18). Se ha operado con 25 ml de fase acuosa quedando siempre la disolución 0,3 M en HCl y 2,0 M en NaCl, el volumen de acetato de butilo es de 5 ml. Se mezclan diferentes volúmenes de Au(III) 10^{-4} M y fenosafranina 10^{-4} M, de forma que la suma de $[\text{AuCl}_4^-] + [\text{fenosafranina}^+]$ se mantenga siempre constante e igual a $2 \cdot 10^{-5}$ M.

La figura 8 muestra los valores de las absorbancias de los extractos orgánicos obtenidos para distintas fracciones molares de Au(III) desde 0 a 1. Puede observarse que el máximo valor de A, correspondiente a la intersección extrapolada de las rectas, se encuentra para $f = 0,5$, lo que

señala la estequiometría Au(III): fenosafranina 1:1 y pues para la fórmula del compuesto extraído $(\text{AuCl}_4)^-$ -fenosafranina⁺.

Para valores de $f < 0,5$, experiencias en las que existe un exceso de fenosafranina respecto a la concentración de Au(III), se han corregido las absorbancias de los extractos con las de los respectivos blancos. En esta zona la concentración de fenosafranina presente en los blancos es la correspondiente a la que se indica para cada punto menos la necesaria para formar el complejo AuCl_4^- -fenosafranina⁺.

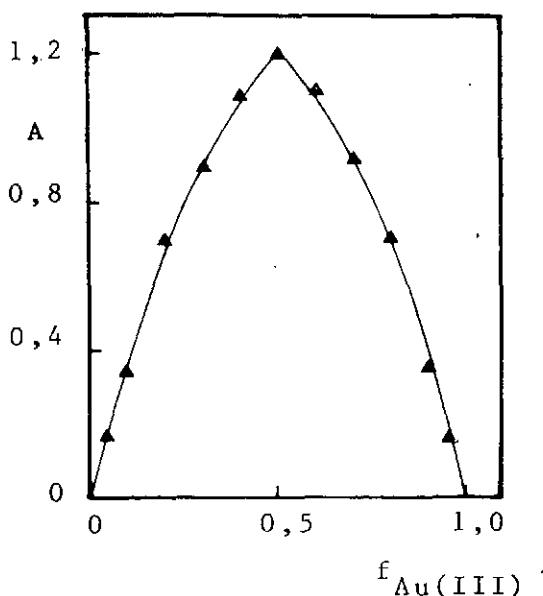


FIGURA 8.—Método de las variaciones continuas:
 $[\text{AuCl}_4]^- + [\text{Feno}]^+ = \text{cte.} = 2,10^{-5} \text{ M.}$

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN. ESTABILIDAD DEL COMPUESTO EXTRAÍDO

Con aplicación del método espectrofotométrico que se recomienda y utilizando dos concentraciones de Au(III) de 0,1 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$ y relaciones $V_{\text{aq}}/V_{\text{org}}$ de 5 se determinó el porcentaje de extracción. El valor medio obtenido fue superior al 99 %, por lo que puede considerarse la extracción como prácticamente cuantitativa.

Se ha comprobado que el compuesto extraído en acetato de butilo es estable al menos durante 48 horas en las condiciones ordinarias de iluminación de un laboratorio.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE Au(III). REPRODUCIBILIDAD DE LOS MÉTODOS

Siguiendo el procedimiento espectrofotométrico recomendado y descrito en la Parte Experimental existe relación lineal entre las absorbancias y la [Au(III)] entre 0,05-1,5 microgramos/mililitro, referidos al contenido en la fase acuosa. La absorptividad con respecto a la fase orgánica es $4.48 \cdot 10^4 \text{ l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

En el método espectrofluorimétrico se obtiene linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la [Au(III)] en la fase acuosa entre 5-150 nanogramos/mililitro.

Las reproducibilidades de los dos procedimientos calculadas con aplicación de métodos estadísticos se efectuó con diez medidas aisladas en cada caso. Las desviaciones estándar obtenidas $1,2 \cdot 10^{-2}$ y $1,8 \cdot 10^{-2}$ para los métodos espectrofotométrico y espectrofluorimétrico, respectivamente, siendo los errores relativos de los procedimientos de $\pm 1,2 \%$ y $\pm 1,8 \%$.

EFECTO DE IONES EXTRAÑOS EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Se ha realizado un amplio estudio de las posibles interferencias provocadas por la presencia de distintos cationes inorgánicos y aniones sobre la determinación de Au(III) mediante los métodos que se proponen.

Para ello se han preparado numerosas muestras a las que se les ha adicionado el ión extraño antes que los restantes reactivos, se han utilizado 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Au(III) y como máximo se han ensayado 100 $\mu\text{g/ml}$ del ión extraño. Las absorbancias de cada disolución se miden a 527 nm, frente a un blanco preparado de igual forma pero sin Au(III) ni ión extraño.

En la tabla 1 se detallan los resultados obtenidos para el método espectrofotométrico. Se considera un ión como interferente cuando conduce a valores de absorbancia superiores al $\pm 2,5 \%$. Puede destacarse que un gran número de iones metálicos y aniones no interfieren hasta concentraciones muy elevadas, por lo que el método puede considerarse como altamente selectivo. Interfieren seriamente Tl(III), Hg(II), Pt(IV) entre las especies metálicas y I^- , SCN^- entre los aniones inorgánicos. Resultados similares se obtuvieron cuando se utiliza el método espectrofluorimétrico.

DETERMINACIÓN DE ORO EN PLOMOS

Los métodos espectrofotométrico y espectrofluorimétrico para la determinación de oro que se proponen se han aplicado a la determinación

de este metal en plomos de fundición que contienen cantidades muy pequeñas de oro, entre 2 y 10 g/Tm.

Siguiendo los procedimientos recomendados en la Parte Experimental se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 2, se han comparado con los obtenidos por aplicación del método de absorción atómica, pudiendo comprobarse que son concordantes.

TABLA I

EFFECTO DE DIVERSOS IONES EN LA DETERMINACION DE 12,5 µg DE Au (III)

<i>Ión</i>	<i>Añadido como</i>	<i>Cantidad, µg</i>	<i>Au (III) encontrado, µg</i>
K ⁺	K ₂ SO ₄	10.000	12,49
NH ₄ ⁺	(NH ₄) ₂ SO ₄	10.000	12,53
Mg ²⁺	MgSO ₄	10.000	12,48
Fe (III) *	Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 9H ₂ O	10.000	12,76
Co (II)	CoCl ₂	9.000	12,85
Ni (II)	Ni(SO ₄) · 6H ₂ O	9.200	12,76
Cu (II)	Cu(SO ₄) · 5H ₂ O	10.000	12,75
Ag (I)	Ag(NO ₃)	5.000	12,72
Zn (II)	Zn(CH ₃ COO) ₂	8.000	12,60
Cd (II)	Cd(CH ₃ COO) ₂ · 2H ₂ O	10.000	12,87
Hg (II)	Hg(CH ₃ COO) ₂	100	12,10
Pd (II)	PdCl ₂	10.000	12,86
Pt (IV)	H ₂ PtCl ₆	1.000	12,36
Sn (IV)	SnCl ₄	500	12,89
Cr (III)	Cr(NO ₃) ₃	5.000	12,86
Tl (III)	TlCl ₃	2	12,01
Sb (III)	SbCl ₃	100	12,61
Sb (V)	KSb(OH) ₆ · H ₂ O	100	12,63
In (III)	InCl ₃	200	12,71
Ga (III)	GaCl ₃	200	12,67
Bi (III)	Bi(NO ₃) ₃	5.000	12,81
Al (III)	KAl(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	10.000	12,53
Mn (II)	MnSO ₄ · H ₂ O	10.000	12,73
Pb (II)	Pb(HC ₃ COO) ₂	10.000	12,43
F ⁻	NaF	10.000	12,43
Br ⁻	NaBr	10.000	12,41
I ⁻	NaI	15	12,70
SCN ⁻	KSCN	5	12,83
ClO ₄ ⁻	NaClO ₄	2.000	12,91
SO ₄ ²⁻	K ₂ SO ₄	10.000	12,62
PO ₄ ³⁻	HK ₂ PO ₄	5.000	12,87
CH ₃ COO ⁻	NaCH ₃ COO	10.000	12,57
NO ₃ ⁻	NaNO ₃	10.000	12,90

TABLA II

RESULTADOS ANALITICOS DE LA DETERMINACION DE ORO EN PLOMOS
contenido en oro, g/Tm

<i>Muestra núm.</i>	<i>Procedimiento propuesto</i>	<i>Absorción atómica</i>
1	2,1	2,0
2	7,5	7,5



BIBLIOGRAFIA

1. CHAMP, P.; FAUCONNIER, P., y DUVAL, C., *Anal. Chim. Acta*, 1951, 5, 277-281.
2. RILOU, C. B.; GARRINI, E., *Ann. Chim. (Rome)*, 1955, 45, 767-772.
3. COTTON, T. M., y WOOLF, A. A., *Anal. Chim. Acta*, 1960, 22, 192-194.
4. YOUNG, R. S., *Analyst*, 1951, 76, 49-52.
5. DAS, N. R., y BHATTACHARYYA, S. N., *Talanta*, 23, 535 (1976).
6. FOGG; BURGESS, C., y THORBURN BURNS, D., *Analyst*, 90, 1012 (1970).
7. POPA, G.; PATRESCU, C., y PETICARU-VIRGOLICI, *Rev. Chim. (Bucharest)*, 28, 64 (1977).
8. CONSTANTINESCU, G. C.; CATUNEANU, R., y CONSTANTINESCU, C., *Rev. Chim.*, 27, 333 (1976).
9. CONSTANTINESCU, C., y CONSTANTINESCU, G. G., *Rev. Chim. (Bucharest)*, 30, 1248 (1979).
10. CONSTANTINESCU, G. C., *Rev. Roum. Chim.*, 25, 1249 (1980).
11. CONSTANTINESCU, G. C., y CONSTANTINESCU, C., *Rev. Roum. Chim.*, 25, 1259 (1980).
12. MARINENKO, J., y MAY, J., *Anal. Chem.*, 40, 1137 (1968).
13. BLYUM, I. A.; PAVLOVA, N. N., y KALUPINA, F. P., *Zh. Anal. Khim.*, 26, 55 (1971).
14. HERNÁNDEZ CÓRDOBA, M.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C., y LÓPEZ GARCÍA, I., *Afinidad*, XXXIX, 169 (1982).
15. TARAYAN, V. M., y MIKAELIAN, D. A., *Arm. Khim. Zh.*, 22, 308 (1969).
16. TARAYAN, V. M., y MIKAELIAN, A. A., *Arm. Khim. Zh.*, 34, 545 (1981).
17. SIERRA HERNÁNDEZ, M. I.; LÓPEZ GONZÁLEZ, A.; SIERRA HERNÁNDEZ, M. T., y SIERRA JIMÉNEZ, F., *An. Quim.*, 74, 1409 (1978).
18. IRVING, H., y PIERCE, T. B., *J. Chem. Soc.*, 2565 (1959).