

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología de Valencia
(Prof. J. García-Blanco)

Determinación del cobre en tejidos animales mediante la difeniltiocarbazona

por F. ROYO MINUE y F. MARCO ORTS

Recibido para publicar el 6 de julio de 1948

En un artículo anterior (1) expuso F. Royo Minué un método para la determinación fotométrica del cobre mediante la difeniltiocarbazona, examinándose en detalle la especificidad, error y sensibilidad del mismo. Concebido el método para su aplicación en material biológico, describimos en el presente trabajo la adaptación para su empleo en tejidos animales. Puesto que la valoración fué descrita en el trabajo antes citado, sólo haremos mención en el presente de ciertas variantes en la técnica de ajuste del pH que le dan mayor rapidez y seguridad.

Exponemos los resultados obtenidos en los ensayos sobre recuperación de cobre añadido al tejido al iniciarse las operaciones, completando así el examen realizado en el trabajo ya citado, y las determinaciones de cobre efectuadas en distintos órganos del perro.

INCINERACION DEL TEJIDO

En un granatario y sobre un vidrio de reloj se pesa aproximadamente una cantidad de tejido comprendida entre 2,5 y 3 gramos. Mediante una varilla de vidrio se pasa el tejido a un matraz Kjeldahl de 50 c. c. previamente limpio, seco y tarado, y se pesa al miligramo. Si se trata de hígado basta pesar entre

0,5 y 1 gramo, y si de sangre se toman con una jeringuilla de 8 a 10 c. c. y se vierten en el matraz Kjeldahl para su pasada.

Determinado el peso, se agregan 3 c. c. de ácido sulfúrico 2 N. En el caso de sangre conviene evaporar antes gran parte del agua, calentando el matraz con una ligera llama.

Después de la adición del ácido sulfúrico 2N se calienta sobre tela metálica regulando la llama hasta obtener una ebullición muy ligera. Cuando se ennegrece la masa se retira el matraz del fuego y se añade 2 c. c. de mezcla (3 partes de ácido nítrico concentrado y una parte de ácido perclórico d. 1,67) y se continúa calentando moderadamente; el tejido se disgrega y el líquido toma color amarillo rojizo que más tarde se oscurece. Se agrega entonces 1 c. c. más de mezcla y vuelve a calentarse repitiéndose las ediciones de mezcla, en lo sucesivo 0,5 c. c. cada vez, y calentamiento, hasta que éste determine la aparición de un líquido incoloro y transparente de muy escaso volumen y que al enfriarse se transforma en masa blanca pastosa.

Mientras la masa permanezca de color pardo hay que procurar que exista siempre líquido presente agregando la mezcla antes de que la masa se concentre excesivamente, pues de lo contrario la oxidación excesivamente rápida puede determinar la ignición del tejido en el interior del matraz y proyección al exterior de parte del mismo.

Una vez frío se disuelve el residuo en 3 c. c. de agua bidestilada y se decanta mediante un pequeño embudo en una probeta de 10 c. c. estrecha y bien aforada. Se lava el matraz dos veces con 3 y 2 c. c. de agua bidestilada que se reúnen en la probeta y se completa el volumen de ésta.

El tiempo invertido varía entre 5 y 8 horas. Es conveniente disponer de una batería de Kjeldahls para ahorrar tiempo en las determinaciones múltiples.

VALORACION DEL COBRE

De la solución obtenida con el residuo de incineración se toman con una pipeta 3 a 4 c. c.; si el tejido era hígado basta 1 a 2 c. c.; se vierten en un separador de forma oval o esférica de 50 c. c. de capacidad (asegurarse de que la llave

sin engrasar cierra bien) y se completa el volumen si ha lugar hasta 3 c. c. Se añade una gota de solución de rojo de metilo (0,02 grs. en 100 c. c. de alcohol al 50 %) y amoníaco concentrado gota a gota hasta viraje al amarillo, agregando entonces una gota de amoníaco normal. Se añade 0,5 c. c. de cianuro potásico al 1/500, se agita un poco y se agrega sulfúrico normal hasta viraje al rojo del indicador, añadiendo entonces 3 a 4 gotas más (0,15 a 0,2 c. c.). El pH queda por debajo de 3. Se agita fuerte 2 a 3 minutos y se añade 0,2 c. c. (4 gotas) de solución saturada de fosfato monopotásico (exento de cobre o en contacto durante varias horas con un poco de solución de ditizona) y amoníaco normal gota a gota hasta viraje al amarillo. Se añaden 3 gotas de solución de rojo de fenol (0,02 grs. en 100 c. c. de alcohol al 50 %) y amoníaco N/5 hasta viraje del amarillo a rosa débil (pH 6,5-6,8). Se agregan entonces los 5 c. c. de solución de ditizona y se continúa la valoración tal como se describió en el trabajo anterior citado (1).

Ensayo en blanco. — Este debe hacerse con todos los reactivos empleados con el tejido, por lo que en otro Kjeldahl se colocarán las mismas cantidades de sulfúrico y mezcla nítrico-perclórico empleadas en aquél y se calentará hasta casi sequedad, diluyendo y completando con agua bidestilada hasta 10 centímetros cúbicos. En la valoración se empleará el mismo volumen utilizado con el problema.

Si hay que hacer repetidas determinaciones en tejido es preferible determinar de una vez para siempre la equivalencia en cobre de los reactivos empleados en la incineración, y operar con un blanco de valoración, es decir, sólo con los reactivos utilizados en la fase de valoración, restando al final del valor de cobre hallado en el tejido el correspondiente a los reactivos de incineración.

RECUPERACION DE COBRE POR EL METODO

Se tritura una pequeña cantidad de tejido y se distribuye en dos porciones; se pesan y se agrega a una de ellas una cantidad conocida de cobre en forma de solución de sulfato de cobre; se incineran y se determina el contenido del mismo

en ambas fracciones. A continuación damos los resultados obtenidos en varias operaciones :

TEJIDO EMPLEADO: PANCREAS

Grs. tejido emplados en la valoración	Cobre añadido gamas	Cobre hallado gamas	Cobre preexistente gamas	Cobre recuperado gamas	Recupe- ración %
0,6227	—	0,68	0,68	—	—
0,6889	1,8	2,43	0,75	1,68	93
0,6343	2,4	3,20	0,69	2,51	105
0,6090	—	0,66	0,66	—	—
0,6772	0,6	1,32	0,73	0,59	98,5
0,6937	1,2	1,84	0,75	1,09	91
0,6064	1,8	2,47	0,66	1,81	100

El valor de recuperación promedio es 97,5 % y las oscilaciones están dentro de las desviaciones normales del valor medio en el método.

COBRE HALLADO EN DIVERSOS ORGANOS DEL PERRO

Perro	Tejido incinerado gr.	Grs. tejido emplados en la valoración	Cobre hallado gamas	Cobre en 100 grs. de tejido gamas
<i>Sangre</i>				
B	11,841	2,3682	2,53	107
B	11,841	2,9603	2,82	96
D	7,132	1,4265	1,36	95,5
D	7,132	2,4955	2,70	108
<i>Intestino grueso</i>				
A	3,991	1,1974	1,32	102
E	0,922	0,4610	0,44	95,5
A	3,691	1,1075	1,14	103
<i>Intestino delgado</i>				
A	3,667	1,1002	2,30	210
A	2,601	0,7803	1,66	213
<i>Páncreas</i>				
A	3,953	1,1859	1,34	114
A	3,848	0,9620	1,09	113
D	2,249	0,6747	0,63	93,5
D	2,030	0,6090	0,66	108

Perro	Tejido incinerado grs.	Grs. tejido empleado en la valoración	Cobre hallado gamas	Cobre en 100 grs. de tejido gamas
<i>Bazo</i>				
B	2,119	0,4240	0,66	156
C	2,115	0,6334	0,93	147
C	2,009	0,6024	1,02	170
C	2,009	0,6024	1,16	193
D	2,265	0,9061	1,64	180
<i>Corazón</i>				
D	2,104	0,4208	1,56	371
D	2,104	0,6312	2,41	383
D	2,108	0,6326	2,23	353
D	2,108	0,6326	2,40	380
<i>Cerebro</i>				
C	3,782	0,9454	4,49	473
C	3,193	0,9578	4,08	427
<i>Riñón</i>				
D	1,956	0,3911	3,02	773
D	1,956	0,3911	3,01	771
D	2,082	0,4164	3,19	765
D	2,082	0,4164	2,86	690
<i>Hígado</i>				
B	2,407	0,2407	8,0	3.320
B	2,212	0,2212	6,5	2.930
D	2,081	0,2081	5,8	2.790
D	2,081	0,2081	6,2	2.970
D	2,270	0,2270	7,04	3.080

Aunque el escaso número de animales utilizados, tan sólo 5, no permite establecer el valor medio de la concentración de cobre en los distintos órganos, pues en la mayoría de los casos las cifras se refieren sólo a uno o dos animales, su comparación indica claramente que en intestino grueso y páncreas la concentración de cobre es análoga a la de sangre, aumenta progresivamente y por este orden en bazo, intestino delgado, corazón, cerebro, riñón y experimenta una enérgica elevación en hígado, que se manifiesta como auténtico órgano de depósito.

En cuanto al valor absoluto de las cifras halladas por nosotros coinciden en líneas generales con las que se dan en la Bibliografía, en general con cierta vaguedad. La coincidencia

es perfecta en la sangre con las cifras dadas últimamente por SACHS y colaboradores (2). Hemos de hacer destacar la elevada cifra encontrada en hígado, considerablemente superior a la que encontramos en nuestra bibliografía, si bien por las razones antes apuntadas, no podemos formar juicio de la variación fisiológica de la concentración de cobre en este órgano, probablemente importante.

Resumen

Se expone la determinación del cobre en tejidos animales mediante un método previamente descrito por uno de los autores. Se examina la recuperación del cobre añadido y se dan los resultados obtenidos en la valoración del cobre en distintos órganos del perro.

Summary

The determination of copper in animal tissues by means of a method previously described is exposed. The recovery of added copper is examined and the results obtained in the evaluation of copper in various organs of the dog are given.

Bibliografía

1. *R. esp. Fisiol.*, **3**: 177, 1947.
2. SACHS, A., LEVINE, V. E., HILL, F. C., and HUGHES, R.: *Arch. Int. Med.*, **71**: 489, 1943.