97
2 ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

CARACTERIZACION DEL METALOCROMICO ZINCON (ACIDO 2-CARBOXI-2'-HIDROXI-5'-SULFOFORMAZILBENCENO) Y SU USO EN SISTEMAS BIOLOGICOS

Tesis que para obtener el título de Bióloga presenta

ELENA MARIA HILARIO ANDRADE

México, D.F. 1990

FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN

En este trabajo se reporta la caracterización detallada del metalocrómico Zincon. El Zincon forma complejo con Zn^{2+}, Cu^{2+} y Hg^{2+}, produciendo cambios de color detectables por espectrofotometría; los complejos que forma con Fe^{2+}, Mn^{2+} y Ca^{2+} también son detectables por espectrofotometría ya que producen una disminución en la absorbancia de las soluciones de Zincon. El Mg^{2+} no interactúa con el Zincon, ni cambia sus características espectroscópicas.

La presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} no interfieren con las características espectrales del complejo Zn-Zincon. Se determinaron las constantes de disociación, asociación y los diferentes complejos que forma el Zincon. Los valores de $\Delta\epsilon$ son muy grandes, en el orden de 6 a 49 mM^{-1} cm^{-1}, por lo que este método espectrofotométrico es muy sensible.

El complejo Zn-Zincon es completamente reversible, mientras que el complejo Cu-Zincon lo es parcialmente. El Zincon libre y los complejos Zn-Zincon y Cu-Zincon no se reparten a solventes orgánicos; el Zincon no atraviesa la membrana de liposomas ni interacciona con membranas biológicas.

Es posible utilizar el Zincon para medir la velocidad de salida de Zn^{2+} al dializar muestras biológicas.

Todas estas características hacen del metalocrómico Zincon un reactivo muy útil en el estudio de sistemas biológicos.

ABREVIATURAS

λmáx.	longitud de onda de absorbancia máxima
BCl	bacteriocloroflila
CAPS	ácido (3-(ciclohexilamino)- 1- propano sulfónico
CHES	ácido (2-(N-ciclohexilamino)-etanosulfónico
conc.	concentración
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter) N, N, N', N'-tetraacético
g	fuerza de la gravedad 9.8 ms^{-2}
MES	ácido (2-(N-Morfolino)etanosulfónico
MOPS	ácido (3-(N-Morfolino)propanosulfónico
nm	nanómetros
NTA	ácido nitrilotriacético
p.e.	punto de ebullición
p.f.	punto de fusión
p.i.	punto isosbéstico
PIPES	(ácido (Piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfonico)); ácido 1,4-Piperazinedietanosulfónico))
PM	peso molecular
prot	Proteína
rpm	revoluciones por minuto
TRIS	hidroximetilaminometano
Triton X-100	Octil fenoxi polietoxietanol
$\overline{V}$	velocidad promedio de salida de Zn^{2+}
vol.	volumen
Zincon	ácido 2-carboxi-2'hidoxi-5'sulfoformazilbenceno

CAPITULO 1 GENERALIDADES

1.1 Importancia del Zinc en Biología.

La importancia de los metales en los procesos biológicos se comprobó desde hace pocos lustros, sin embargo, los estudios específicos sobre su participación son recientes (Vallee, 1989). Dichos estudios han avanzado a la par de los métodos analíticos para su determinación. Bajo la clasificación del Zinc como elemento traza, basada en la concentración en los tejidos, es relativamente abundante, ya que con los nuevos métodos analíticos se ha comprobado en mucho mayor concentración de lo que se conocía. Estos descubrimientos ha propiciado gran interés en diferentes áreas de la biología, medicina y química.

La función biológica del Zinc y demás metales se puede esquematizar en base a los resultados biológicos, como se muestra en la siguiente figura:

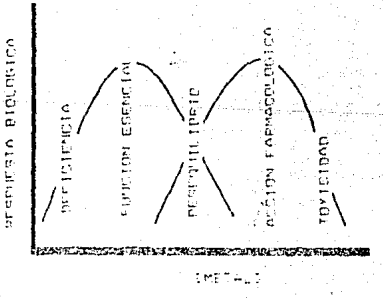


Fig. 1.1. Respuesta biológica a varios niveles de metal. (Tomada de Vallee y Gulpe, 1989).

Se pueden establecer varias analogías en los estudios realizados, la importancia del Zinc en los procesos biológicos

c) Etapa [illegible] nucleótidos que dependen de la disponibilidad del Zinc en el desarrollo, crecimiento y diferenciación de los órganos ([illegible], 1980).

El Zn participa, [illegible] como un componente integral de muchas enzimas, indispensable para su función catalítica y equilibrio estructural (Vallee y Galdes, 1984). Una de las áreas más estudiadas es la bioquímica de proteínas que contienen Zinc. Dependiendo de la naturaleza de estabilidad entre el metal y la proteína se pueden dar dos tipos de interacciones: las metaloproteínas y los complejos metal-proteínas. En las metaloproteínas, el metal está tan firmemente unido a la proteína que no es posible removerlo durante la purificación de la proteína; en los complejos metal-proteína, el ion metálico no está firmemente unido a la proteína, [illegible] es muy débil y puede removerse al dializar la proteína (Riordan y Vallee, 1980).

Las metaloenzimas o los complejos metal-proteína se comportan como un ácido de Lewis, debido a las propiedades del ion metálico de comportarse como un centro de carga positiva disponible para la catálisis ácida de Lewis, en [illegible] donde la catálisis por protones es inefectiva, y donde el ion metálico podría ser precipitado como hidróxido (Coleman y Gettins, 1983).

d) Etapa clínica, donde se evidencian varios síntomas clínicos asociados con alteraciones en el metabolismo del Zinc en vertebrados, principalmente en humanos (Prasad y Harley, 1979). Dentro de las manifestaciones clínicas se ha observado

que, por deficiencia de Zinc en ratas gestantes, [illegible] más de 100 malformaciones, que afectan el esqueleto, cerebro, corazón, ojos, tracto gastrointestinal, pulmones, por lo que la mortalidad en etapa fetal aumenta (Vallee y Galdes, 1984). En la etapa adulta, una de las patologías que se presenta son los trastornos neurológicos que pueden causar locura (Vallee, 1983).

d) Clave de la importancia de la regulación génica, por medio de la identificación de los mecanismos de transcripción génica, en eucariotes a través de factores transcripcionales en forma de dedos de Zinc (Evans y Hollenberg, 1988) (Klug y Rhodes, 1987).

En 1994, Vallee y Auld reportaron 300 metaloenzimas de Zinc encontradas en diferentes organismos y con diferentes actividades. Algunas de las más abundantes se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Metaloenzimas con Zinc

Nombre	No.	Fuente	Función
Clase I OXIDOREDUCTASAS			
Alcohol deshidrogenasa	11	vertebrados, plantas	A,B
Superóxido dismutasa	17	vertebrados, plantas, hongos y bacterias	B
Clase II TRANSFERASAS			
Aspartato transcarbamilasa	1	E. coli	B
RNA polimerasa	6	trigo, bacterias, virus	A
DNA polimerasa	7	erizo de mar, E. coli, fago T4	A
Fosfomanosa isomerasa	2	varios organismos	A
Clase III HIDROLASAS			
Fosfatasa alcalina	11	mamíferos, bacterias	A,B
Aminopeptidasa	17	mamíferos, hongos, bacterias	A,B
Carboxipeptidasa A	6	vertebrados, crustáceos	A
Carboxipeptidasa B	4	mamíferos, crustáceos	A
Colagenasa	5	mamíferos, bacterias	A

[illegible]

Pirofosfatasa inorgánica   14   levadura [illegible]

Clase IV LIASAS

Fructosa-1,6-difosfato aldolasa

[illegible]	4	Invertebrados, hongos	[illegible]
Anhidrasa Carbónica	26	animales, plantas	[illegible]
[illegible]	18	mamíferos, levaduras	[illegible]

Clase V ISOMERASAS

Fosfomanosa isomerasa	1	levadura	[illegible]

Clase VI LIGASAS

tRNA sintetasa	[illegible]	B. stearothermophilus, E. coli	[illegible]
Piruvato carboxilasa	2	levaduras, bacterias	[illegible]

Función: Catalítica, Estructural, Reguladora, Para substratos, Transportadora. (Adaptado de Vallee y Galdes, 198[illegible])

Los metales biológicos son los iones metálicos que han persistido a lo largo de la evolución de los organismos, la diferenciación de las funciones metabólicas depende de la carga positiva, la afinidad electrónica y las características estéricas. La carga positiva (Na^+, K^+ y Ca^{2+}, por ejemplo) que forman parte en los potenciales eléctricos de las membranas celulares. La afinidad electrónica en la formación de catálisis y [illegible] energía, así como de la estabilidad estructural de algunas proteínas [illegible] hierro de la hemoglobina y citocromos [illegible], respectivamente, por ejemplo. En los [illegible] catalíticos [illegible] [illegible] y [illegible] por [illegible] ejemplo [illegible] requieren gran velocidad [illegible] [illegible] esencial para producir los potenciales de [illegible] [illegible] cuando [illegible] organización [illegible]

[illegible] (electrón, complejo, electrón, carga, [illegible], hendiendo) (Williams, 1977).

Como cuando [illegible] la fase [illegible] interaccionan [illegible] con cargas positivas, en la [illegible] de la [illegible] se [illegible] una amplia variedad de fenómenos en los [illegible].

1.1.1 Clasificación de los metales.

Dependiendo como [illegible] al formar complejos, los metales [illegible] clasificados en dos grupos (Burger, 1973):

A. Iones metálicos que forman complejos más estables con donadores electrónegativos (N_2, O, [illegible]) que con donadores electropositivos (P, S, [illegible]). En su [illegible] de coordinación más altos, la mayoría [illegible] metálicos forman complejos con [illegible], [illegible], [illegible] por ejemplo Mn, y lantánidos [illegible] la tabla de clasificación.

B. Iones metálicos que forman complejos estables con donadores electropositivos (P, S, [illegible]) por ejemplo, muchos iones metálicos en una [illegible] de oxidación baja como Cu^{+}, Ag^{+}, Pd^{2+}, Pt^{2+}, Hg^{2+}, Tl^{3+}, Au^{3+}, In^{3+}, Au^{+} [illegible] por [illegible].

[illegible] Irving y Williams, 1953) el orden de estabilidad de complejos (B) [illegible] de [illegible] de la primera [illegible] de metales de transición es:

$$Mn < Fe < Co < Ni < Cu > Zn$$

(dependiendo [illegible] del ligando participante Williams, 1953).

Otra forma de clasificar los [illegible] es [illegible] electrónicos [illegible] (Pearson, 1963).

Table 1.2. Clasificación de los metales

según su estructura electrónica

	Configuración electrónica	Ejemplos
(i)	$1s^2$	Li^+, Be^{2+}
(ii)	ns^2np^6	metales alcalinos
(iii)	$(n-1)d^{10}$	Cu^+, Zn^{2+}, Cd^{2+}
(iv)	$(n-1)d^{10}ns^2$	Tl^+, Sn^{2+}, Pb^{2+}
(v)	$(n-1)d^1 \rightarrow (n-1)d^9$	metales de transición
(vi)	$(n-2)f^1 \rightarrow (n-2)f^{14}ns^2np^6$	lantánidos (n=5), actínidos (n=6)

El Zinc perteneciendo al grupo del tipo (iii), se caracteriza por su relativo alto poder de polarización del ion y por lo que [illegible] aunque que tenga tendencia tener un carácter significativamente covalente. Los metales del grupo IIB de la Tabla Periódica (Zn, Cd, Hg) muestran un carácter más covalente con donadores por átomos de O y N, y con capacidad de formar complejos con ligandos que tengan S como donador. Generalmente, son tetracoordinados y rara vez pentacoordinados (Bell, 1977).

1.3 Métodos analíticos para cuantificar Zinc

El desarrollo, evolución y entendimiento de los mecanismos por los cuales el Zinc interviene en un gran número de procesos biológicos ha aumentado desde [illegible] métodos analíticos para su cuantificación (Vallee y Galdes, 1984).

En Química Analítica se utilizan métodos para detectar y cuantificar Zinc, de los cuales destacan por su alto nivel de

[illegible] los métodos de espectroscopía atómica (interacción de [illegible] con radiaciones del espectro visible). En general, estos procedimientos [illegible] de T [illegible] espectrofotometría de absorción atómica, espectroscopía de fluorescencia [illegible]. Tanto [illegible] las técnicas [illegible] fuente de [illegible] [illegible] de disociación de la radiación y su [illegible] de la [illegible] libre [illegible] y [illegible] dependiendo, en la mayoría de las [illegible] de la aplicación, tipo, número y [illegible] de muestras, [illegible] requerida [illegible] requerida. A continuación [illegible] límites de detección de [illegible] Figueras (Martínez [illegible] 1.3 [illegible] de [illegible] y [illegible], 1984).

Tabla 1.3. Límites de detección de Zinc

Técnica	Límite (g)
Espectrofotometría de absorción atómica	[illegible]
Espectroscopía de absorción atómica	[illegible]
Espectrofotometría de fluorescencia atómica	[illegible]
Polarografía	[illegible]
Voltametría [illegible]	[illegible]
Análisis de activación del neutrón	[illegible]
Espectroscopía de masas con fluorescencia secundaria	[illegible]
Espectroscopía de masas por inducción [illegible]	[illegible]
Fluorescencia de rayos X	[illegible]
Fluorescencia de rayos X inducida por [illegible]	[illegible]

En la espectrometría de emisión atómica los átomos de una muestra se encuentran en fase gaseosa como [illegible] [illegible] [illegible] y [illegible] temperaturas de llama [illegible] al nivel energético más alto, [illegible], se emiten los átomos excitados pierden su energía emitiendo un fotón. La energía emitida por los átomos al regresar a su estado basal es característica y se observan como líneas cuando se captura en papel fotográfico. Sin embargo, no todos los átomos quedan excitados, algunos sólo son excitados y otros sólo se ionizan. Tampoco toda la energía se emite, parte se pierde por colisiones. Las principales ventajas de la espectroscopía de emisión atómica son: su alta sensibilidad [illegible], posee muy bajos límites de detección para muchos elementos, la instrumentación es relativamente simple de manipular, permite analizar muchos elementos rápidamente y [illegible] simultáneamente, varios elementos. Las principales limitaciones de este método se centran en el tipo de fuentes de excitación, ya que son fuentes de baja temperatura, los elementos con alta energía de excitación no se pueden excitar, [illegible] las fuentes de alta temperatura [illegible] [illegible] complejos con emisión de fondo que requieren costosos espectrómetros de alta resolución.

La espectrometría de absorción atómica se basa en la energía absorbida por los átomos gaseosos previamente en la fuente de excitación [illegible] cuantitativamente se basa en la ley de Lambert-Beer. Un [illegible] es posible analizar cantidades [illegible] de muestra, utilizar pequeños volúmenes de muestra y aumentar la sensibilidad [illegible] veces más que el método anterior.

[illegible] de los [illegible] por espectroscopía de absorción [illegible] posible hacer análisis simultáneos de varios elementos [illegible]

En la técnica de [illegible] de fluorescencia [illegible] los átomos al [illegible] energía [illegible] Este tipo de [illegible] se distingue de la [illegible] en que la absorción y la emisión de [illegible] Por medio de esta energía [illegible] a la misma longitud de onda [illegible] los átomos [illegible] (como ocurre con [illegible]) [illegible] simultáneamente varios elementos.

Con los tres métodos antes descritos se han determinado [illegible] por ejemplo [illegible] de [illegible] de órganos de [illegible] de la [illegible] de [illegible] y [illegible] de *Euglena gracilis* [illegible] y [illegible] (1970) [illegible]

El método de [illegible] negativo [illegible] del electrodo de grafito [illegible] iones metálicos en solución [illegible] completamente [illegible] el potencial [illegible] es posible identificar los metales por el potencial [illegible] del electrodo. Por este método [illegible] principalmente [illegible] sin embargo, [illegible]

en solución [illegible]

[illegible] rayos gamma, [illegible] [illegible]

[illegible]

[illegible]

Las [illegible] [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] K^+, Ca^{2+} y Mg^{2+} [illegible]

[illegible]

1.3 Indicadores Metalocrómicos

1.3.1 Definición

Los indicadores metalocrómicos son compuestos que presentan por color características notablemente de un ion metálico varía en la solución. Esto se debe a la formación del complejo entre el indicador y el ion metálico, que produce una modificación en los niveles de energía del indicador y un cambio en la longitud de onda donde ocurre el cambio al indicador (Skoog, 1979).

1.3.2 Formación del complejo indicador metalocrómico-metal

La estabilidad de los complejos está determinada por las propiedades físicoquímicas del ion metálico y del ligando, principalmente por sus configuraciones electrónicas y relaciones de energía. Dependiendo de la carga del ion metálico, la estructura electrónica y la estabilidad pueden formar complejos con varios ligandos con diferente estabilidad (Burgess, 1978).

Para la formación de una especie estable se requiere una compatibilidad entre los orbitales electrónicos compartidos del átomo central con los orbitales de los electrones del ligando que pueden ser de forma diversa. Cuando se dice que el ion metálico está coordinado, se refiere a que el complejo también es electrónico. El tamaño del átomo central también es un factor significativo en la afinidad metálica (Burgess, 1978). Cada ion tiene un pH adecuado para que los metales coordinados no precipiten en la proporción 1:1 (metal: ligando) (Burgess, 1978).

1.3.3 Cambios de color debido a la formación del complejo

El color, es el resultado de la absorción de radiación en una figura o parte de la región visible del espectro electromagnético. Un absorbido generalmente corresponde hacia las regiones cercanas al UV e infrarrojo, y está relacionado con la excitación de electrones de niveles de energía bajos a niveles más altos.

Cuando el ligando sufre pérdida de niveles energéticos que producen los cambios en la absorbancia debidos a la formación del complejo metal-ligando, dependen difícilmente de la naturaleza del ligando, en especial. Entre ellos:

a) Transferencia de carga entre los orbitales del metal y ligando y, los orbitales del ligando, metálicos. Los valores que representan los niveles de energía, son bastante altos y, generalmente, producen la aparición de bandas en la región ultravioleta. Estos cambios se observan en la práctica debido a la pérdida de electrones de los iones complejos.

b) Transición entre ligandos: Los ligandos orgánicos, que contienen electrones π, pueden producir transiciones π-π* que aparecen en la región de UV o a longitudes de onda cortas dentro del espectro visible. Los agentes quelantes con este tipo de electrones π, que forman y los que producen el color, pertenecen a compuestos heterocíclicos, el cual presenta una o más grupos cromóforos en su estructura molecular, como son:

- Grupo carbonilo
- C=S Alcano
- C=N-OH Oximas

que producen desplazamientos en las bandas de absorción hacia el rojo [illegible] que absorbe el indicador libre, [illegible] efecto [illegible] [illegible] [illegible] estructura. Los [illegible] [illegible] característicos [illegible] pueden [illegible] [illegible] (quelatación) para [illegible] pequeñas cantidades de los metales.

c). Transiciones de transferencia de carga. La transferencia [illegible] de un electrón del ligando [illegible] al metal o viceversa. La transferencia de carga del ligando hacia el metal es por reducción del ion metálico; la transferencia de carga del metal hacia el ligando es por oxidación de éste. Este tipo de transición da una [illegible] [illegible] de absorción comparable a la transición entre orbitales [illegible] (Bell, 1977).

Las diferencias de color entre el indicador metalocrómico y el complejo que forma con el ion metálico generalmente son grandes, y estas se pueden usar para determinar cuantitativamente concentraciones de ion metálico en solución, por espectrofotometría ([illegible], 1974).

1.3.4 Características biológicamente útiles de los metalocrómicos

A continuación se presentan las características deseables de los metalocrómicos, para que puedan ser utilizados como tinciones histológicas.

Afinidad por [illegible] [illegible] constante de disociación	Alta (mM)
Δε coeficiente de extinción molar diferencial	Alto ($M^{-1} cm^{-1}$)
Solubilidad en agua	Alta
Solubilidad en solventes orgánicos	Pequeña
Efectos colaterales	Ninguno
Estabilidad	Alta, por varios meses
Tiempo de relajación	Pequeño (ms)
Interferencia con cambios de índice de refracción pequeños	Ninguna

La afinidad del metalocrómico por el ion metálico debe ser baja para que éste no altere considerablemente la concentración del ion metálico libre. [illegible] el equilibrio entre [illegible] metalocrómico [illegible] complejo. Bajo las condiciones [illegible] la constante aparente de disociación se calcula de la siguiente forma.

[illegible]

ESPECIFICIDAD [illegible]

Esta característica presupone cambios apreciables en la absorbancia debidos a la concentración del ion metálico.

El coeficiente de extinción molar Δε, indica el cambio en la absorbancia que experimenta una solución 1 mM de indicador metalocrómico debido a concentraciones saturantes de los metales en una celda de 1 cm de ancho y a una cierta longitud de onda.

[illegible] El [illegible] de [illegible] diferentes [illegible] de [illegible]

La alta absorbancia [illegible] se puede interpretar [illegible] biológicas. [illegible] de [illegible] absorbancia [illegible]

[illegible]

Las interferencias con pigmentos [illegible] adicionales, etc., [illegible] evitarse. [illegible] debido a [illegible] en la región de 300-700 nm [illegible] clorofílicos, [illegible], etc. [illegible] ya que los principales picos [illegible] de 400 [illegible] de 500 nm, [illegible] 470 [illegible] 435, 470, 478 y 508 [illegible]

[illegible] 480 y 760 nm, [illegible] (1979), [illegible] 500 nm, [illegible] 540 nm [illegible]

1.7.5 Indicadores metalocrómicos utilizados en Química Analítica y en Biología

[illegible] la tabla 1.4 se muestran algunos metalocrómicos utilizados principalmente en Química Analítica. El [illegible] de Eriocromo BB, Murexida, Naranja de Xilenol, Azul de Bromofenol III y Azul de Tymol son ampliamente empleados en estudios biológicos (Rosipal, 1977).

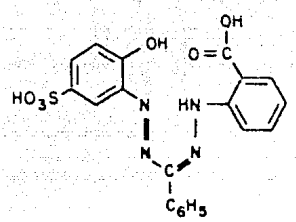
Tabla 1.4. Metalocrómicos para varios iones metálicos*

Metal	Metalocrómico	Pmax (nm)
Al	Eriocromo Cianina R	535
Ba	Alizarina	515
[illegible]	[illegible]	515
Ca, Mg	Diferoxamina	[illegible]
Cd, Zn, [illegible]	Metalocromo (1-(2,5-dimetil-4-(4-fenoxifenil)-1H-fenantrolina)	477
[illegible]	Bathophenanthroline (4,7-difenil-1,10-fenantrolina), 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina (bathocuproina)	484
Co, Ni	Zincon (Rosipal y [illegible], 1977)	612
Cu, Ni	1-(2-piridilazo)-2-naftol	512
Fe	Ferrina	510
Hg, Cd	Ditizona (4-fenil)	550
	Pyrocatechol violet (pirocatecol violeta) y [illegible]	
	Bathophenanthroline (Rosipal y [illegible], 1977)	490
Mg	Eriocromo	535
	Eriocromo (Rosipal, 1977)	530
Mg	Azul de Eriocromo BR	575
Mn	Eriocromo	540-547
	[illegible]	475-485
	[illegible]	475-485
	Azul de Eriocromo III	475-485
	[illegible]	530-537
[illegible]	Rojo de Tiron	555
[illegible]	Naftolazina de [illegible]	445
[illegible]	Eriocromo	475/485
[illegible]	Eriocromo T (Rosipal y [illegible], 1977)	475
Pb	Eriocromo	575-580
	Eriocromo T (Rosipal y [illegible], 1977)	490
	1-(2-piridilazo)-2-naftol (Eriocromo [illegible]) (Rosipal y [illegible], 1977)	491

*Adaptado de Rosipal y Durgeová, 1977.

1.3.6 Estudios sobre el metalocrómico Zincon

Zincon es el nombre abreviado propuesto para el compuesto 2-hidroxi-2'-carboxil-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbencano, en la figura 1.2 se muestra su estructura.



2-carboxi-2'-hidroxi-5'-Sulfoformazilbencano

ZINCON

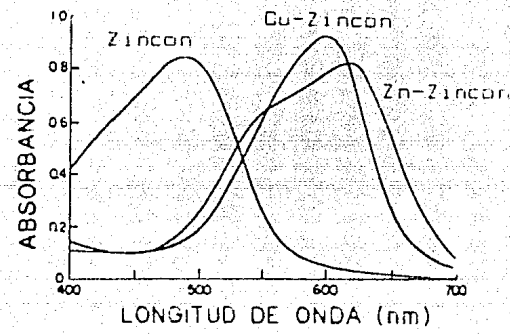


Fig. 1.2 Estructura química y espectros de absorción del complejo Zincon y complejos Zn-Zincon y Cu-Zincon.

En su estructura se distinguen dos grupos funcionales basicos, -NH, imino y -OH, enólico, suficientes para formar interacciones con el ion metálico a pH neutro, y dos grupos ácidos, -COOH, carboxilo y -SO3H, sulfónico, que pierden un protón al coordinarse con el ion metálico.

En 1974, D. Dick y J. Yoe reportaron el desarrollo de un nuevo método colorimétrico para cuantificar Zinc y Cobre, utilizando Zincon. Ambos elementos forman un complejo color

todo, han estudiado [illegible] de pH 8.5 - [illegible] encontrando que el complejo Zn-Zincon [illegible] es en un intervalo de pH [illegible]. Además, determinaron las longitudes de onda donde la absorbancia es máxima (Zn: 620 nm [illegible] para el complejo Zn-Zincon y 480 nm para [illegible]) y que la relación estequiométrica [illegible] Zinc y Zincon es de 1:1.

Después, en [illegible] investigó las interferencias de otros iones metálicos en el método colorimétrico desarrollado por [illegible] y [illegible] que el [illegible] también [illegible] complejo colorido con Zincon estable [illegible], mientras que otros complejos [illegible] de la zona. El [illegible] Zincon [illegible] pH [illegible] los iones metálicos que interfieren en la formación del complejo Zn-Zincon son: Fe^{3+}, Cr^{3+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, NH_4^{+}, Al^{3+}, Sb^{3+}, Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, In^{3+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, PO_4^{3-}, NO_2^{-}, CH_3COO^{-} en [illegible] mayor [illegible] y [illegible] dichas interferencias producen complejos coloridos como: Mn-Zincon, [illegible] Fe-Zincon, [illegible] de color [illegible] en el grado de Ni^{2+} y Co^{2+}.

[illegible] et al. [illegible] desarrollaron un método espectrofotométrico para determinar Cobre en presencia de [illegible] con el agente quelante EDTA, bajo la siguiente reacción:

$$Cu^{2+} + Zincon + Zn\text{-}EDTA \longrightarrow Cu\text{-}EDTA + Zn\text{-}Zincon + H^{+}$$

donde la reacción debe ocurrir preferentemente con Cu^{2+} y no con Ag^{+}. También reportaron las interferencias [illegible].

[illegible]

1.4 OBJETIVO

Ninguno de los trabajos sobre el metalocrómico Zincon antes mencionados ha reportado las características físicas y químicas que permiten utilizarlo en sistemas biológicos.

Dichas características se basan en los criterios expuestos por Antonio Scarpa (1977) y sobre éstos se fundamentan el objetivo de este trabajo: determinar las características físicas y químicas que permitan el uso del Zincon en sistemas biológicos.

Para llevar a cabo el objetivo, se realizó la siguiente secuencia para obtener los datos necesarios:

A) Determinación de las constantes de asociación, disociación y ε para los complejos Zn-Zincon, Cu-Zincon y otros cationes divalentes por medio de espectrofotometría de doble rayo. Con dichas constantes es posible determinar el intervalo de concentraciones de metal que puede detectar el metalocrómico, los cambios en la absorbancia detectables con diferentes concentraciones de metalocrómico, y la afinidad de los complejos.

B) Reversibilidad de los complejos metal-metalocrómico.

Esta característica ha sido aprovechada en los métodos quelatométricos (Sadek, 1959) para detectar metales que no forman complejos con Zincon. También es útil para los estudios en sistemas biológicos para no alterar las concentraciones de metales en las células.

C) Solubilidad en solventes orgánicos alifáticos y aromáticos, hexano y tolueno, respectivamente.

D) Interacciones con membranas modelo (liposomas) [illegible] anterior y así reflejar el posible comportamiento del metalocromico en las membranas biológicas, ya que ambas características simulan condiciones de hidrofobicidad.

E) Determinar si existe interacción con membranas biologicas y su potencial uso en sistemas biologicos.

CAPITULO II MATERIALES Y METODOS

2.1 Preparación de soluciones

[illegible]

2.1.1 Soluciones del metaloquímico Zincon

[illegible]

2.1.2 Soluciones amortiguadoras, de agentes quelantes y de iones metálicos

[illegible]

2.2 Espectrofotometría

2.2.1 Principios de espectrofotometría

2.2.2 Espectrofotometría de doble haz [illegible]

2.3 Reparto en solventes orgánicos

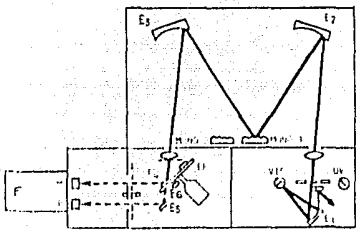
[illegible]

[illegible]

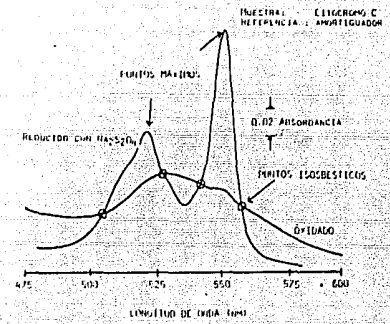
[illegible]

[illegible]

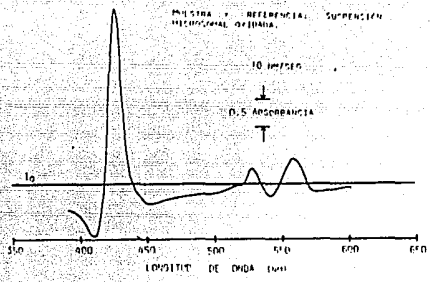
[illegible]



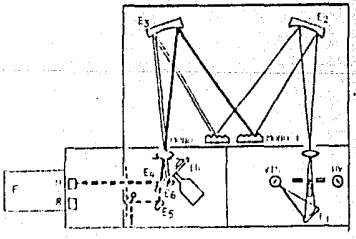
A. MODO DIFERENCIAL



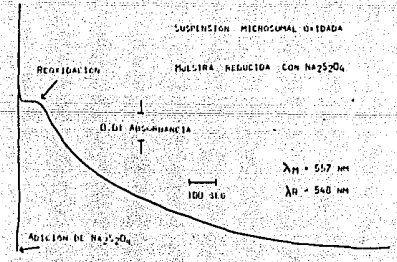
B. ESPECTRO ABSOLUTO EN BARRIDO (MODO DIFERENCIAL)



C. ESPECTRO DIFERENCIAL EN BARRIDO (MODO DIFERENCIAL)



D. MODO DUAL



E. ESPECTRO DIFERENCIAL EN DOS LONGITUDES DE ONDA. (MODO DUAL)

F = FOTOMULTIPLICADOR
MONO = MONOCROMADORES
VIS = LAMPARA DE LUZ VISIBLE
UV = LAMPARA DE LUZ ULTRA VIOLETA
λM = LONGITUD DE ONDA MAXIMA
λR = LONGITUD DE ONDA DE REFERENCIA (PUNTO ISOSBESTICO)
ER = ESPEJO ROTATORIO
I0 = LUMEN BRUTO
R = REFERENCIA
E = ESPEJOS
M = MUESTRA

FIG. 2.1 TRAYECTORIA DE LA LUZ EN EL ESPECTROFOTOMETRO DE DOBLE HAZ LUMINOSO. MODO DIFERENCIAL Y MODO DUAL.

2.4 Preparación de membranas modelo (liposomas)

2.E Preparación de membranas biológicas

2.E.1 Mitocondrias de corazón de rata

[illegible]

2.E.2 Sarcoplasmas permeables

[illegible]

[illegible] Condiciones

2.5.3 *Rhodobacillus viscosus* celular y [illegible]

[illegible]

2.5.4 Cuantificación de proteína y bacteriorrodopsina

[illegible]

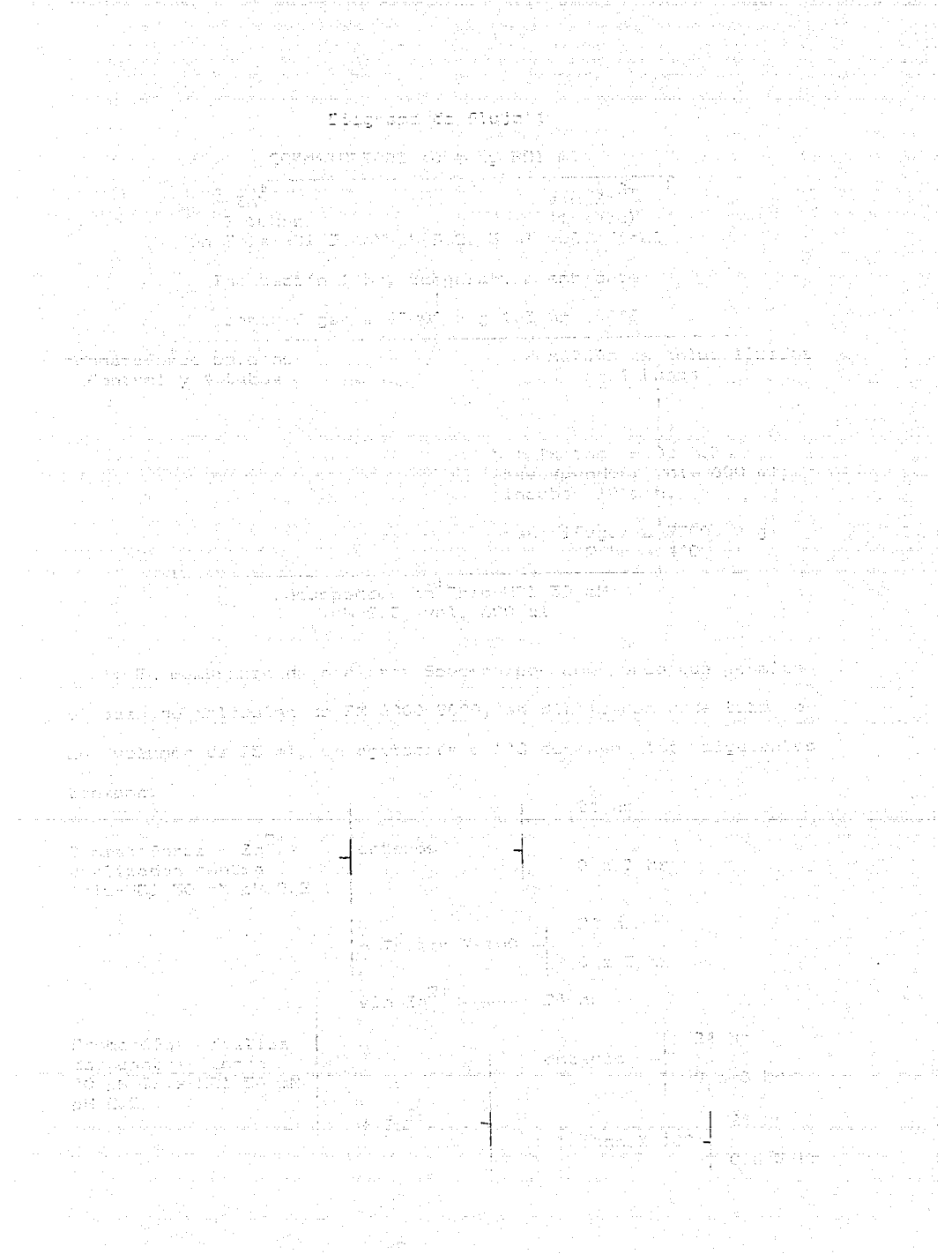
2.5.5 Intercambio con membranas biológicas

[illegible]

2.6 Incorporación de Zn^{2+} en cromatóforos de Rh. rubrum y dializados contra Zincon

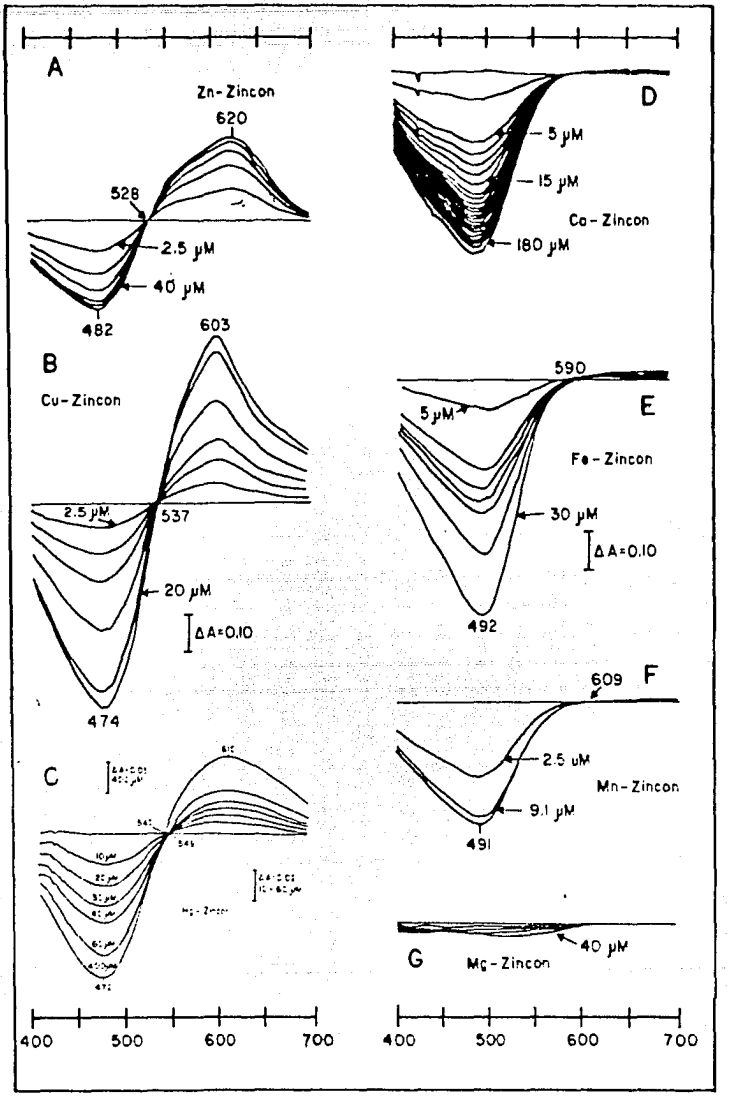
[illegible]

Diagrama de Circuito



CAPITULO 7 - RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Espectros diferenciales de los complejos metal(Zinc(II)) Obtención de las constantes de disociación, asociación y coeficiente de extinción molar



LONGITUD DE ONDA (nm)

Fig. 3.1 Espectros diferenciales de los complejos Metal-Zincon. Condiciones: Zincon 40 μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2 y las concentraciones de metal indicada.

A

Δ

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

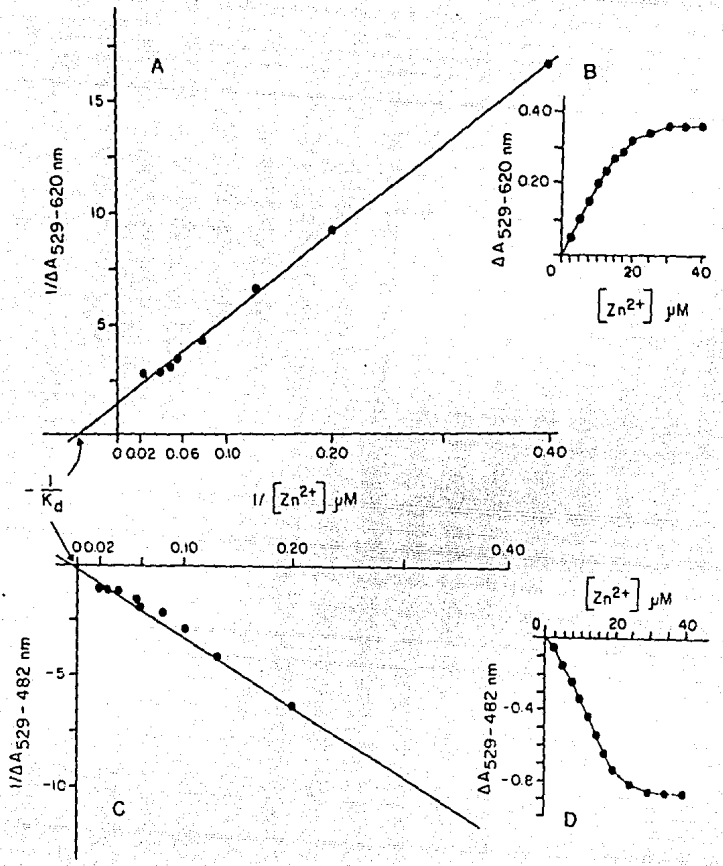


Fig. 3.2 Gráficas de dobles recíprocas en la región de hipercromismo (A) e hipocromismo (C) de los cambios en absorbancia contra concentraciones crecientes de Zn^{2+}. B y D son las gráficas lineales. Condiciones: celda de referencia y muestra contienen Zincon 40μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2 y las concentraciones indicadas de Zn^{2+}, vol. final 3 ml.

Tabla 3.1 Constantes de asociación, disociación y para los complejos Metal-Zincon y en presencia de otros metales

Complejos p.i. y Amax	$log_{10}Ks$	Kd (μM)	$\Delta\epsilon(mM^{-1}cm^{-1})$
Cu^{2+}			
537-600 nm	4.39	40.01	28.79
537-474 nm	2.57	2662.18	-2136.70
Zn^{2+}			
529-620 nm	4.19	64.44	46.25
529-482 nm	3.89	127.32	-
Zn^{2+} + Mg^{2+} 40 μM			
529-620 nm	4.12	74.39	49.66
Zn^{2+} + Ca^{2+} 40 μM			
529-620 nm	4.28	52.39	41.66
Zn^{2+} + Ca^{2+} 100 μM			
529-620 nm	4.39	40.29	34.71
Hg^{2+}			
540-610 nm	3.07	832.20	6.94
540-472 nm	3.00	997.80	-13.35
Fe^{2+}			
590-492 nm	4.30	49.50	-99.24
Mn^{2+}			
609-491 nm	5.49	3.16	-22.57
Ca^{2+}			
597-490 nm	3.42	372.75	-63.65
Mg^{2+}	0	0	0

Los valores de las constantes para Fe^{2+}, Mn^{2+} y Ca^{2+} se obtuvieron a intervalos de 1 min en la titulación. Condiciones: Zincon 40μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2, vol. final 3 ml para cada uno.

7.2 Curvas de pH para Zincon, Zn-Zincon y Cu-Zincon con diferentes amortiguadores

[illegible]

[illegible]

[illegible]

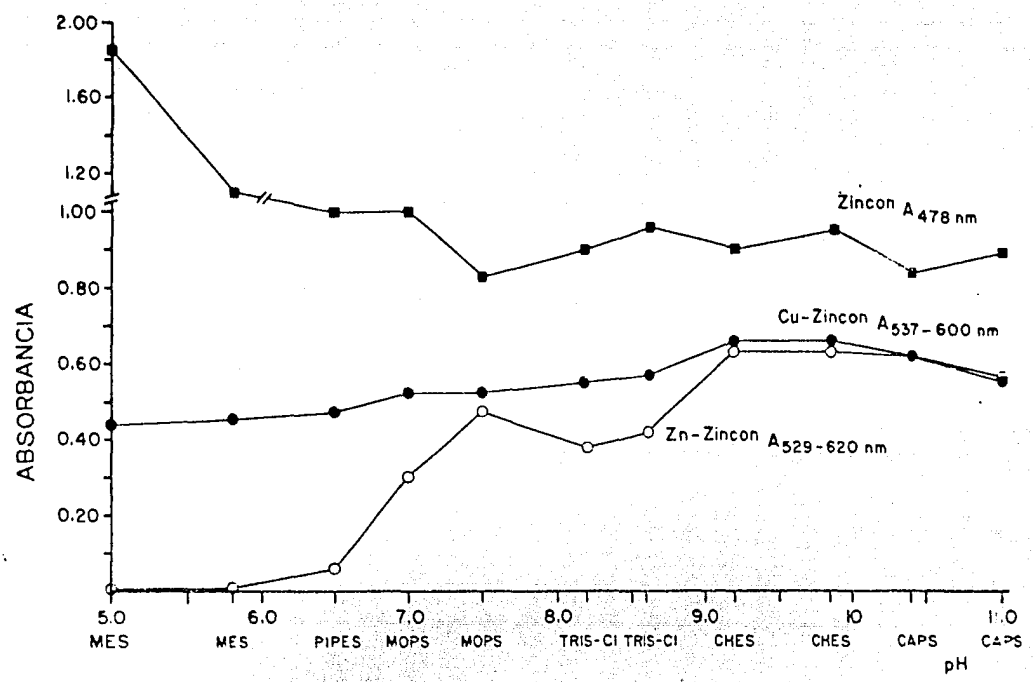


Fig. 3.3 Perfiles de pH para Zincon, Zn-Zincon y Cu-Zincon. Condiciones: Amortiguador 500 mM pH indicado en el eje X, Zn-Zincon y Cu-Zincon 1:1 40 µM cada especie, vol. final 3 ml.

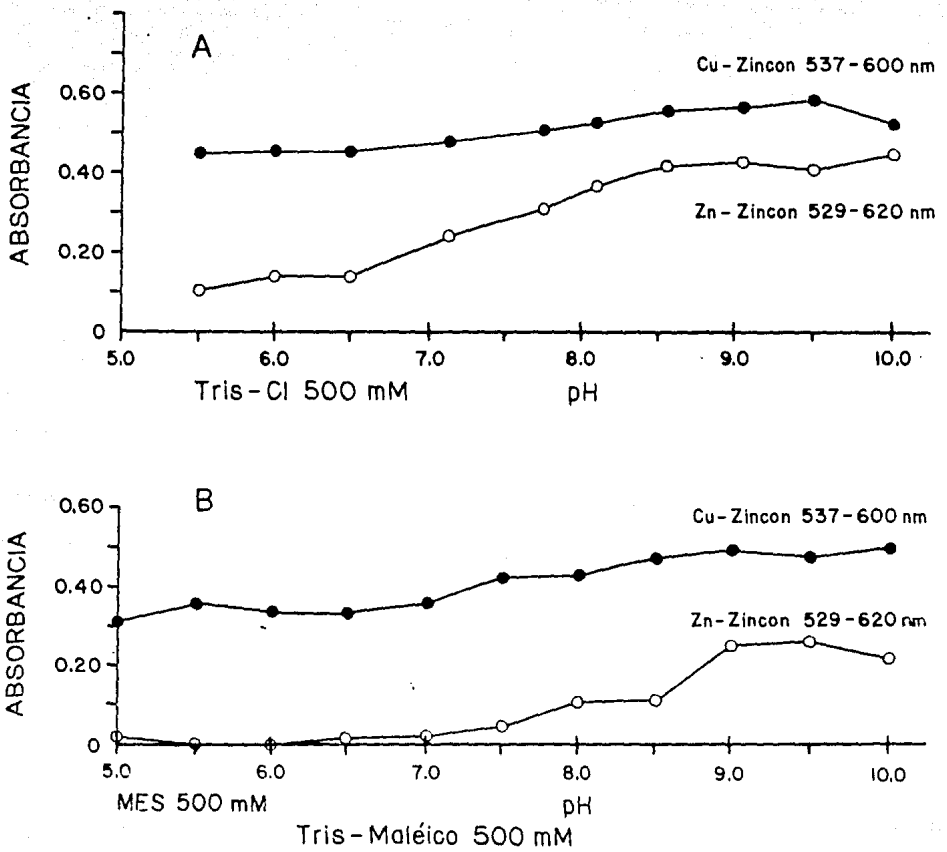


Fig. 3.4 Perfiles de pH para Zn-Zincon y Cu-Zincon.
Condiciones: A, Tris-HCl 500 mM; B, MES 500 mM pH 5.0 y 5.5, Tris-Maléico 500 mM pH 6.0 a 10.0; Zn-Zincon y Cu-Zincon 1:1, 40 µM cada especie, vol. final 3 ml.

[illegible] Establecimiento de los complejos

[illegible] y [illegible]

[illegible]

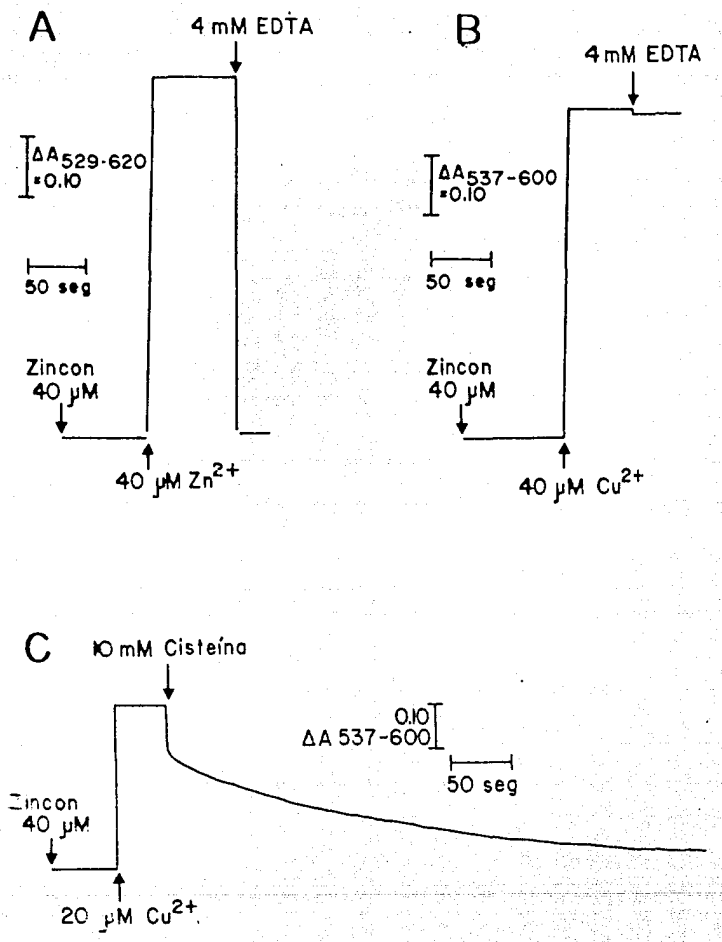


Fig. [illegible].5 Reversibilidad de los complejos Zn-Zincon y Cu-Zincon. Condiciones: Zincon 40 μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2 y las concentraciones de EDTA, EGTA y Cisteína indicados, vol. final 3 ml.

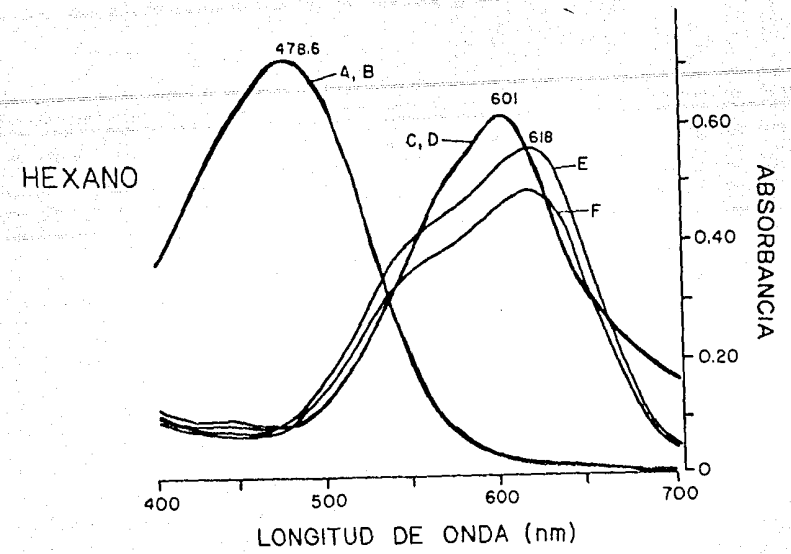
Tabla 3.2

Efecto de los agentes quelantes sobre los complejos Zn-Zincon y Cu-Zincon

Metal	% metal quelado con:							
	EDTA		EGTA		NTA	CISTEINA		
	4 mM	10 mM	4 mM	10 mM	4 mM	4 mM	10 mM	
Zn^{2+}	96.9	-	98.3	97.5	96.5	-	-	
Cu^{2+}	1.85	1.83	1.85	-	1.83	99.3*	96.3@	

Condiciones: Zincon 40 μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2, vol. final 3 ml; EDTA, EGTA, NTA y Cisteína 4 mM y 10 mM cada uno, conc. final; Zn^{2+} y Cu^{2+} 40 μM, conc. final. Datos obtenidos por espectrofotometría de doble haz, modo dual, a 529-620 nm para Zn-Zincon y 537-600 nm para Cu-Zincon. (-) no se determinó; (*) en 44.3 min; (@) en 21.6 min.

3.0. Reporte en solventes orgánicos.



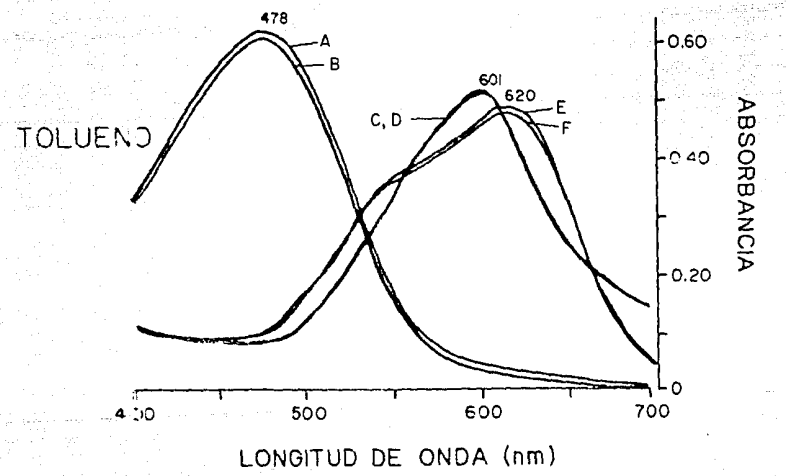


Fig. [illegible] Espectro en solventes orgánicos. Espectros absolutos. A, C y E Zincon, Cu-Zincon y Zn-Zincon 1:1, 40 μM cada especie, Tris-HCl 50 mM pH 8.2, vol. final 3 ml; B, D y F fase acuosa extraída de la mezcla con 3 ml hexano o tolueno (ver secc. 2.3 del Capítulo II Materiales y Métodos)

Tabla 3.3

Reparto del Zincon y los complejos Metal-Zincon en solventes orgánicos

Solvente	% de recuperación en la fase acuosa		
	Zincon	Zn-Zincon	Cu-Zincon
Hexano	100	87.5	100
Tolueno	98.3	97.9	100

Condiciones: Cada tubo de ensaye contiene 3 ml de Zincon 40 µM, Zn-Zincon o Cu-Zincon (1:1 cada especie), Tris-HCl 50 mM pH 8.2 y 3 ml de solvente. Se agitaron vigorosamente por 1 min, se dejaron en reposo 20 min y se centrifugaron a 15000 rpm 5 min. Ambas fases se separaron y cuantificaron en un espectrofotómetro de doble haz, trazando espectros absolutos en barrido de 400 a 700 nm. Las fases orgánicas no mostraron cambios en la absorbancia en ningún caso.

3.5 Interacción con membranas modelo

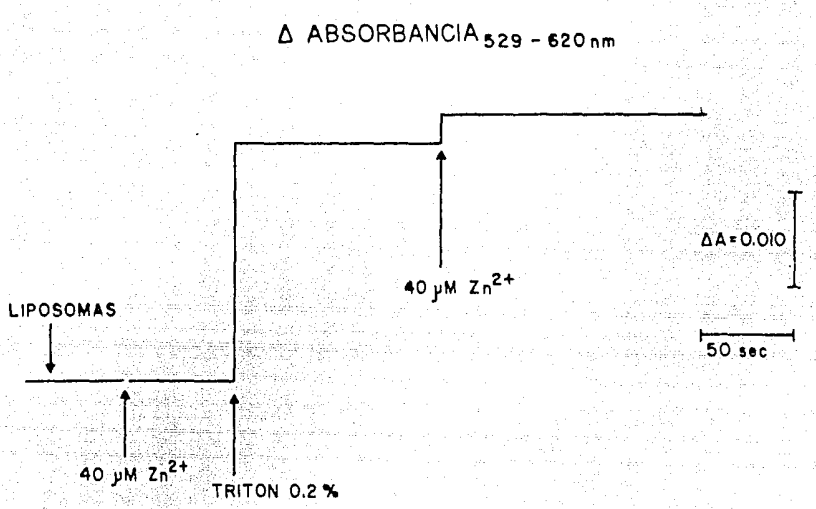


Fig. 3.7 Interacción con membranas modelo (liposomas). Espectro diferencial a 529-620 nm de los cambios en la absorbancia después de agregar Zn^{2+} y Triton X-100 0.2% a liposomas cargados con Zincon, Tris-HCl 50 mM Sacarosa 150 mM pH 8.2, vol. final 3 ml.

3.6 Interacción con membranas biológicas

3.7 Incorporación de Zn^{2+} a cromatóforos

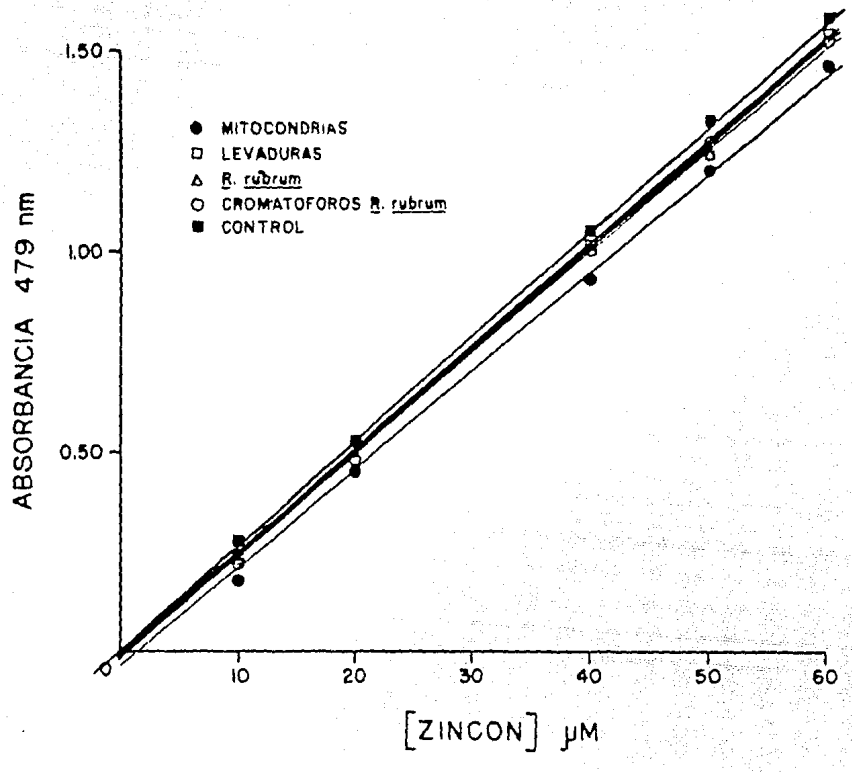


Fig. 3.8 Interacción con membranas biológicas. Condiciones: cada tubo contiene la conc. de Zincon indicada en el eje X, Tris-HCl 50 mM pH 8.2, vol. final 2 ml. Cada membrana se incubó 5 min, las mitocondrias, levaduras y bacterias se centrifugaron 20 min a 15000 rpm a 4°C, los cromatóforos se centrifugaron 1.3 hr a 40000 rpm a 4°C. El sobrenadante se leyó a 479 contra el control (sin membranas).

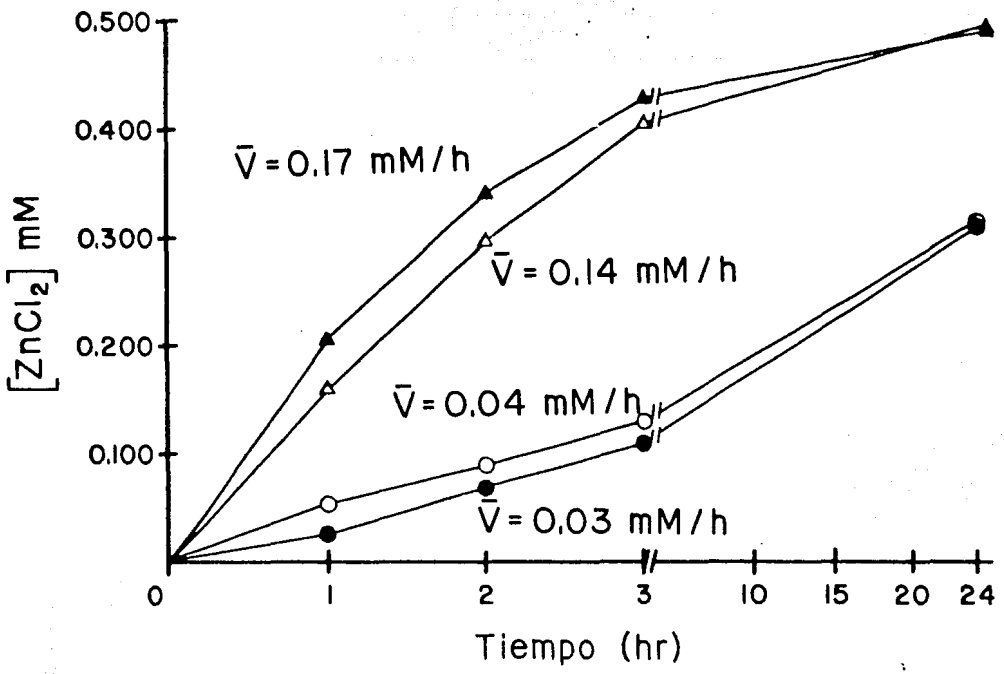


Fig. 3.9 Incorporación de Zn^{2+} a cromatóforos de Rs. rubrum dializados contra Zincon o amortiguador. Condiciones: ver diagrama de flujo 1 de la secc. 2.6 del Capítulo 2. Cromatóforos enteros dializados contra: ●, Tris-HCl 50 mM pH 8.2; ▲, Zincon 40 μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2; Cromatóforos solubilizados y dializados contra: O, amortiguador, Δ, Zincon 40 μM Tris-HCl 50 mM pH 8.2; V (Zn^{2+} mM/hr) dentro de las 3 primeras horas.

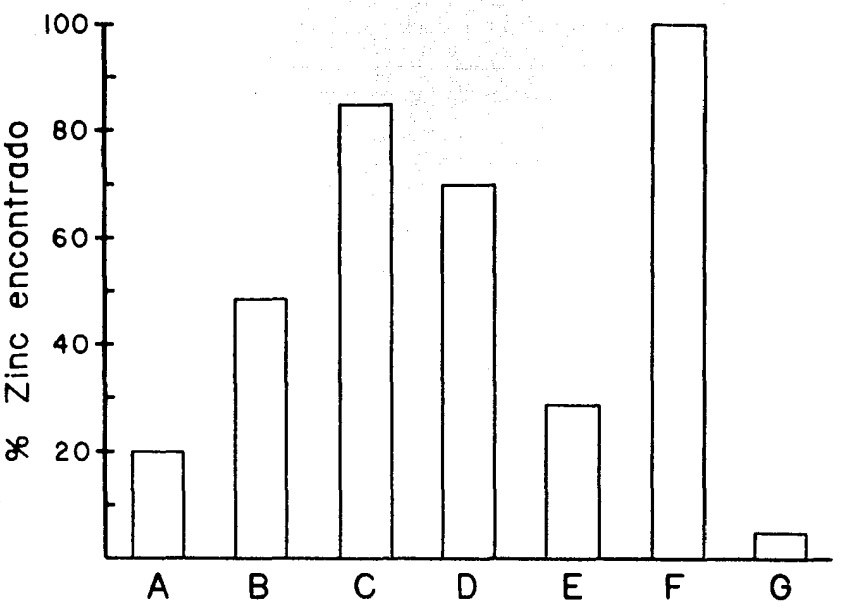


Fig. 3.10 Porcentaje de Zn^{2+} encontrado al cabo de 24 hr en cromatóforos enteros incubados con Zn^{2+}. Condiciones: ver diagrama de flujo 1 de la secc. 2.6 Capítulo 2 Materiales y Métodos. A, sobrenadante del medio de incubación; B, dializado contra Tris-HCl 50 mM pH 8.2; C, dializado contra Zincon 40 µM Tris-HCl 50 mM pH 8.2; D, suma de lo encontrado en A y B (Zn^{2+} fuera del cromatóforo); E, diferencia del medio de incubación menos D (Zn^{2+} dentro del cromatóforo); F, suma de lo encontrado en A y C (Zn^{2+} fuera del cromatóforo); G, diferencia del medio de incubación menos F (error al cuantificar).

CONCLUSIONES

El metalocrómico Zincon es un reactivo útil para cuantificar Zn^{2+} por varias razones:

a) Es selectivo para un grupo reducido de iones metálicos: $Zn^{2+}>Cu^{2+}>Hg^{2+}>Fe^{2+}>Mn^{2+}>Ca^{2+}$ pero no para Mg^{2+}.

b) Debido a que la Kd por Zn^{2+} y Cu^{2+} son muy pequeñas (~60-40 μM) permiten cuantificar dichos iones metálicos desde 2.5 μM hasta 40-60 μM. A pesar de que estos valores de Kd podrían alterar las concentraciones del ion metálico libre, es posible utilizar muy poco Zincon para cuantificarlos, ya que ambos complejos, Zn-Zincon y Cu-Zincon, poseen altos valores de ε, es decir, con muy poco metalocrómico se producen grandes cambios en la absorbancia al formar el complejo metal-metalocrómico. En el caso del complejo Hg-Zincon se puede decir que el Zincon es ideal para cuantificar dicho metal porque los valores de Kd y $\Delta\varepsilon$ son muy altos y el complejo es estable por dos horas.

El Zincon se puede utilizar para cuantificar Ca^{2+}, Fe^{2+} y Mn^{2+} pero tomando en cuenta que los complejos son inestables, por lo que la titulación debe hacerse a intervalos de 1 min. Los iones metálicos Mg^{2+} y Ca^{2+} no interfieren considerablemente en la formación del complejo Zn-Zincon.

c) Una ventaja que posee este método, en comparación con otros metodologías, es que la cuantificación de Zn^{2+}, Cu^{2+} y Hg^{2+} se hacen en un sólo paso, a temperatura ambiente, sin periodos de incubación, sin la intervención de otras reacciones químicas para formar los complejos, no es un método destructivo y no es caro.

Sin embargo, es importante utilizar material de laboratorio escrupulosamente limpio (bien enjuagado con agua bidestilada y libre de polvo es suficiente) y preparar las soluciones con agua bidestilada, ya que es común encontrar contaminaciones por cobre proveniente de la tubería del agua. Por otro lado, las soluciones de Zincon son estables si se congelan a 0°C o -70°C después de utilizarlas.

d) Es posible cuantificar Zn^{2+} por arriba de pH 7.0 -7.5 independientemente del amortiguador empleado; sin embargo, con Tris-HCl 500 mM se puede hacer desde pH 6.0. No existe ningún problema para cuantificar Cu^{2+} desde pH 5.0 hasta pH 11.0 con cualquiera de los amortiguadores utilizados en este trabajo.

e) Debido a que la reversibilidad de los complejos Zn-Zincon y Cu-Zincon son muy diferentes (aunque en teoría debería ser similar debido a los valores de Ks de éstos), el segundo puede alterar las concentraciones de Cu^{2+} libre en forma irreversible.

f) El Zincon, Zn-Zincon y Cu-Zincon no son solubles ni en hexano (solvente alifático) ni en tolueno (solvente aromático); el Zincon no atraviesa membranas modelo y no se une a éstas ni a membranas biológicas, por lo que es posible cuantificar Zn^{2+} en sistemas biológicos sin problemas de que el reactivo o el complejo se introduzca a la membrana o se adhiera a ella, situación que podría alterar las lecturas del método.

g) Una forma de utilizar este metalocrómico es acelerando la salida de Zn^{2+} al dializar muestras que contengan dicho ion metálico. Esta metodología no es nueva ni revolucionaria, ya que es común utilizar agentes quelantes para extraer metales de muestras al dializar. Sin embargo, utilizando Zincon es posible

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

medir inmediatamente la cantidad de Zn^{2+} que se dializa y cuanto queda en la muestra, por medio de espectrofotometría de uno o dos haces luminosos; o puede extraerse solo Zn^{2+}, Cu^{2+} o Hg^{2+} de muestras que además contengan Ca^{2+} y Mg^{2+}, pero no Fe^{2+} o Mn^{2+}.

El estudio detallado de los metalocromicos, en este caso del Zincon, aparentemente ajeno a la Biología, abre nuevas puertas al estudio de la función de los metales de transición en los organismos y son una vía de acercamiento de dos ciencias que cada día están más interrelacionadas: la Química y la Biología.

REFERENCIAS

Bell, C. F. (1977) Principles and application of metal chelation. Claredon Press, Oxford. 147 pp.

Beyer, W. F. y I. Fridovich (1980) An ultra sensitive colorimetric assay for Manganese. Anal. Biochem. 170, 512-519.

Burguer, K. (1973) Organic Reagents in Metal Analysis. In Internat. Series Monographs in Analytical Chemistry. Pergamon Press, Oxford. 268 pp.

Celis, H. (1984) Reconstitucion de la bomba de protones de bacterias fotosintéticas en liposomas. Tesis de Doctorado en Bioquímica. CINVESTAV, IPN. México. 102 pp.

Celis, H. y I. Romero (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of Rhodospirillum rubrum: effects of pH and divalent cations. J. Bioenerg. Biomemb. 19, 255-272.

Chance, B. (1972) Principles of differential spectrophotometry with special reference to the dual wavelength method. Meth. Enzymol. 24V pp. 322-335.

Clayton, R. W. (1963) Toward isolation of a photochemically reaction center in Ros. sphaeroides. Biochim. Biophys. Acta 75, 312-323.

Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom y R. Y. Stainer (1957) The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulphur purple bacteria. J. Cell Comp. Physiol. 49, 25-68.

De Kloet, S. R., R. K. A. Van Wermeskerken y V. V. Konigsberg (1961) Studies on protein synthesis by protoplasts of

[illegible] 47, 138-147.

Devers, S. (1986) Estudio sobre la interacción de la ATPasa mitocondrial y su inhibidor natural. Empleo de marcadores flourescentes. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias Químicas, UNAM, México. 90 pp.

Evans, R. M. y S. M. Hollenberg (1988) Zinc fingers: gilt by association. Cell **52**, 1-3.

Harrison, P. M. y R. J. Hoare (1980) Metals in Biochemitry. Chapman and Hall, London. 78 pp.

Horovitz, C. T. (1988) Is the majjor part of the Periodic System really inessential for life? J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. **2**, 135-144.

Hunt, J. B., S. H. Neece, H. K. Schachman y A. Ginsburg (1984) Mercurial-promoted Zn^{2+} release from Escherichia coli aspartate transcarbamoylase. J. Biol. Chem. **259**, 14793-14803.

Irving, H. y Williams, R. P. J. (1948) Order of stability of metal complexes. Nature **146**, 746-747.

Jensen, A. y S. V. Jorgensen (1984) Analytical Chemistry applied to metal ions in the environment. In Metal Ions in Biological Systems. (S. Helmut Ed.) Vol.18 Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 5-59.

Jezorek, J. R. y H, Freiser (1979) 4-(pyridilazo)resorcinol-based continuous detection system for trace levels of metal ions. Anal. Chem. **51**, 373-376.

Kagawa, Y. y E. Racker (1966) Partial resolution of the enzymes catalizing oxidative phosphorylation. IX Reconstitution of

oligomycin-sensitive triphosphatase. J. Biol. Chem. 241, 2467-2474.

Koupparis, M. A. y P. I. Anagnostopoulou (1986) Automated flow injection spectrophotometric determination of Zinc using Zincon: applications to analysis of waters, alloys and insulin formulations. Analyst 11 , 1311-1315.

Lehninger, A. (1975) Biochemistry. Worth Publishers, Inc., New York, 1104 pp.

Löwry, J. R. et al. (1954) Uptake of radiozinc by normal and diabetic rat pancreas. Science 119, 219-220.

Lowry, O. H., N. J. Rosenberg, A. L. Farr y R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Martell, A. E. y L. G. Sillen (1971) Stability constants of metal-ion complexes. The Chemical Society, London. 865 pp.

Morris, A. G. (1957) The use of Zincon in absorptiometric determination of Mercury. Analyst 82, 34-37.

Mooradian, A. D. y J. E. Morley (1987) Micronutrient status in diabetes mellitus. Amer. J. Clin. Nutr. 45, 877-895.

Ohya, H. y Y. Komai (1988) Zinc uptake of Curtobacterium possesing w-cyclohexyl fatty acids and zinc-binding activity of its membrane. FEMS Microbiol. Lett. 51, 163-168.

Olsen, E. D. (1975) Modern Optical Methods of Analysis. McGraw Hill, Co., New York. 629 pp.

Ono, H. y A. Ito (1984) Transport of the sulfite oxidase into intermembrane space of liver mitochondria: characterization of import and processing activities. J. Biochem 95, 345-

352.

Pine, S. H., J. B. Hendrickson, D. J. Cram y G. S. Hammond (1980) Quimica Organica (4° edicion). McGraw Hill Co., Madrid, 1086 pp.

Rush, R. y J. H. Yoe (1954) Colorimetric determintation of Zinc and Copper with 2-carboxi-2'-hidroxy-5'-sulfoformazylbenzene acid. Anal. Chem. 26, 1345-1347.

Sadek, F. S., R. W. Schmidt and C. N. Reilley (1959) Visual EGTA tritation of Calcium in the presence of Magnesium. Talanta 2, 38-51.

Sandell, E. B. (1950) Colorimetric determination of traces of metals. 2nd ed. Intersciences Publichers, New York.

Scarpa, A. (1974) Indicators of free Magnesium in biological systems. Biochemistry 13, 2789-2794.

Scarpa, A., F. J. Brinley y G. Dubyak (1978) Antipyrilazo III, "A middle range" Ca^{2+} metallochromic indicator. Biochemistry 17, 1378-1384.

Scarpa, A. (1979) Measurements of cation transport with metallochromic indicators. Meth. Enzymol. 56 pp. 301-338.

Shibata, S. (1972) In "Chelates in Analytical Chemistry" (H. Flaschka y A. J. Barnard, Ed.) Vol.4 Marcel Dekker, Inc., New York, pp 116-183.

Smith, A. L. (1967) Preparation, properties and conditions for assay of Mitochondria: Slaughterhouse material, small-scale. Meth. Enzymol. 10,New York. pp.81-86.

Vallee, B. y A. Galdes (1984) The Metalobiochemistry of Zinc

[illegible], [illegible] Enzymes [illegible] 56. [illegible] / Sons, New York, pp. [illegible]-[illegible].

Vallee, B. (1986) In Zinc Enzymes Chapter [illegible] (Bertini, [illegible] et al. Ed) Progress in Inorganic Biochemistry and Biophysics. Birkhauser Boston Inc., 640 pp.

Veillon C. [illegible] y B. L. Vallee (1978) Atomic spectroscopy in metal analysis of enzymes and other biological material. Meth. Enzymol. 54, 446-484.

Weast R. C. Ed. (1968) Handbook of Chemistry and Physics 49th edition. The Chemical Rubber Co., Ohio.

Williams, R. J. P. (1985) The symbiosis of metal and protein functions. Eur. J. Biochem. 150, 231-248.