F A C U L T A D D E F A R M A C I A D E G R A N A D A

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA

DETERMINACION DE SCN^- EN ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA Y DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES

Memoria que presenta para aspirar al Grado de Licenciado en Farmacia,

D. HONORATO JUSTICIA PALOMARES.

F A C U L T A D DE F A R M A C I A DE G R A N A D A

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO:

Prof. Dr. D. Rafael Garcia Villanova

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Licenciado en Farmacia por D. HONORATO JUSTICIA PALOMARES

DIRECTORAS DE ESTA MEMORIA:

Prof. Dra. Dª Mª R. FATIMA OLEA SERRANO

Prof. Dra. Dª Mª DOLORES RUIZ LOPEZ

D. HONORATO JUSTICIA PALOMARES
aspirante al Grado de Licenciado
en Farmacia.

Granada, Junio de 1987

Mi agradecimiento al Dr. D. Rafael Garcia Villanova, por haber hecho posible la realización de este trabajo.
Asimmismo, mi sincero agradecimiento a la Prof. Dra. Dª Mª R. Fatima Olea Serrano y a la Prof. Dra. Dª Mª Dolores Ruiz Lopez que han sido para mi un ejemplar modelo de investigador y una lección de humanidad y vocación universitaria.
Quisiera darle las gracias más sinceras a todos los miembros del Departamento que siempre me brindaron su amistad y ayuda.
A mi familia por el tiempo al que renunciaron para la realización de este trabajo.

A mis padres y hermana

A Fina

I N D I C E

Página

I. INTRODUCCION 2

Agentes bociógenos 4

Distribución del ión tiocianato en la naturaleza . 14

Hidrolisis enzimatica de los glucosidos por la mirosinasa (EC 3.2.2.1.) 22

Caracteristicas químicas y Métodos analíticos de determinación del ión Tiocianato 25

Comportamiento de la Glandula Tiroidea y de los Agentes Bociógenos. 35

OBJETIVOS. 43

II. PARTE EXPERIMENTAL 45

II.1. Instrumental. 45

II.2. Reactivos 47

II.2.1 Disoluciones empleadas 47

II.2.2 Preparación del enzima tioglucosido glucohidrolasa (Mirosinasa). 49

II.3. DETERMINACION DE SCN^- POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA. 54

Página

II.4.7. Cálculos. 120

II.4.8. Ensayos de la mirosinasa por cromatografia gas-líquido. 121

III. DISCUSION DE LOS RESULTADOS. 124

IV. CONCLUSIONES 129

V. BIBLIOGRAFIA 132

I. INTRODUCCION

INTRODUCCION

En lineas generales se propone el término de enfermedad endemica para aquellos casos en los que la incidencia de esta enfermedad supera al 10% de la población. De este modo se puede distinguir entre enfermedad endemica y enfermedad esporádica. El presente trabajo esta incluido en una linea de investigación que pretende el estudio de las posibles causas dieteticas que pueden incidir en una enfermedad endemica presente en una amplia zona de la provincia de Granada. En concreto, se pretende un estudio de las posibles causas nutricionales incidentes en el bocio endemico.

Se define como bocio todo desarrollo anormal y excesivo de la glandula tiroidea. En consecuencia, por lo dicho hasta el momento, habra que considerar como zona de bocio endemico aquellas en las que un elevado número de la población (10%) presente esta anomalia del tiroides.

De forma general se pueden citar algunas zonas en que esta incidencia es muy elevada, de tal modo, que en America se describen numerosos grupos de población tales como los citados por Gaitan (1983),en Colombia, que hace

referencia al distrito de Candelaria. También en el continente americano Barzellato y col. (1967) indican la gran incidencia del bocio endemico entre la población india de Chile.

Paises tan alejados de los citados hasta ahora como la India presentan también nucleos de población en los que se manifiesta bocio endemico tal como señala Degroot (1975), pareciendo que la causa son diversos iones inorganicos presentes en concentraciones excesivas en el agua de bebida.

Ermans y col. (1972) en numerosos trabajos ponen de manifiesto como causa primordial del bocio endemico en diversas regiones centroafricanas, como el Zaire, la ingesta excesiva y continuada de mandioca o cassava.

Hershman y col. (1983) han puesto de manifiesto como causa de bocio endemico, en algunas zonas rurales, el gran consumo de cassava en la dieta de la población. En Japón también se ha manifestado esta endemia en los habitantes de pequeñas islas que se alimentan casi exclusivamente de pescado y otros productos marinos, tal como señala Suzuki (1980), en la isla de Hokkaido.

Por la bibliografia consultada se ha comprobado que en diversas regiones de Europa son frecuentes estas alte-

INTRODUCCION

En lineas generales se propone el término de enfermedad endemica para aquellos casos en los que la incidencia de esta enfermedad supera al 10% de la población. De este modo se puede distinguir entre enfermedad endemica y enfermedad esporádica. El presente trabajo esta incluido en una linea de investigación que pretende el estudio de las posibles causas dieteticas que pueden incidir en una enfermedad endemica presente en una amplia zona de la provincia de Granada. En concreto, se pretende un estudio de las posibles causas nutricionales incidentes en el bocio endemico.

Se define como bocio todo desarrollo anormal y excesivo de la glandula tiroidea. En consecuencia, por lo dicho hasta el momento, habra que considerar como zona de bocio endemico aquellas en las que un elevado número de la población (10%) presente esta anomalia del tiroides.

De forma general se pueden citar algunas zonas en que esta incidencia es muy elevada, de tal modo, que en America se describen numerosos grupos de población tales como los citados por Gaitan (1983),en Colombia, que hace

referencia al distrito de Candelaria. También en el continente americano Barzellato y col. (1967) indican la gran incidencia del bocio endemico entre la población india de Chile.

Paises tan alejados de los citados hasta ahora como la India presentan también nucleos de población en los que se manifiesta bocio endemico tal como señala Degroot (1975), pareciendo que la causa son diversos iones inorganicos presentes en concentraciones excesivas en el agua de bebida.

Ermans y col. (1972) en numerosos trabajos ponen de manifiesto como causa primordial del bocio endemico en diversas regiones centroafricanas, como el Zaire, la ingesta excesiva y continuada de mandioca o cassava.

Hershman y col. (1983) han puesto de manifiesto como causa de bocio endemico, en algunas zonas rurales, el gran consumo de cassava en la dieta de la población. En Japón también se ha manifestado esta endemia en los habitantes de pequeñas islas que se alimentan casi exclusivamente de pescado y otros productos marinos, tal como señala Suzuki (1980), en la isla de Hokkaido.

Por la bibliografia consultada se ha comprobado que en diversas regiones de Europa son frecuentes estas alte-

raciones de la glandula tiroidea.A tal efecto Peltola y col.(1969) indica la presencia de bocio en niños de edad escolar en Finlandia. En regiones montañosas de reciente origen geologico como los Alpes suizos se muestran grandes nucleos de población en los que es muy frecuente el bocio. En este mismo sentido se pueden considerar las Alpujarras granadinas ya que estan enclavadas en la Cordillera Penibetica que es una cadena montañosa formada en los últimos plegamientos geologicos. Aunque no esta perfectamente comprobado, a traves de la bibliografia de que se dispone, se considera como una causa importante el hecho de que el terreno sea pobre en iodo, lo que posiblemente ocurre en estas regiones montañosas.

Agentes bociógenos

Las causas del bocio endemico parecen ser multiples a la vista de los trabajos realizados hasta el momento por numerosos investigadores a nivel mundial. No obstante en este trabajo se pretende unicamente hacer una revisión de las posibles causas dieteticas puestas de relieve desde que en 1871 Fagge definio el bocio endemico.
Se consideró casi exclusivamente, como la causa primor-

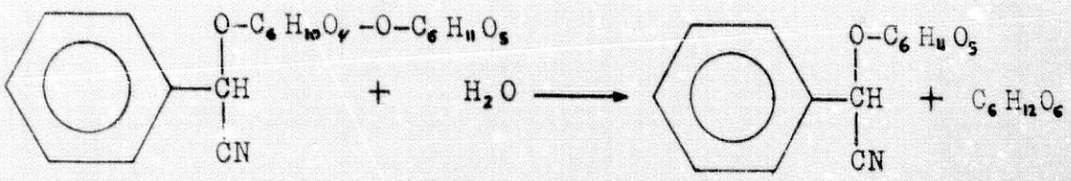
dial, la deficiencia en el aporte de iodo en la dieta. En la actualidad las causas dieteticas parecen ser multiples y se establece un término para denominarlos globalmente, asi se habla de agentes bociogenos, definidos como aquellas sustancias que interfieren la sintesis de las hormonas tiroideas (de forma adquirida para diferenciarlo de los trastornos enzimaticos congenitos).

Los agentes bociogenos pertenecen a diversas categorias quimicas. Asi, por ejemplo, existen iones inorganicos con capacidad bociogena como el CN^-, SCN^-, y con menor importancia, quiza porque no se ha comprobado aún, cabe citar iones como Ca^{++}, F^-, NO_3^-, e incluso el iodo.

De otra parte es preciso recordar a numerosas moleculas organicas, principalmente derivados fenolicos, asi como alquil-sulfuros y derivados de estructuras indeterminadas, posiblemente glucosidos. La clasificación de estos agentes bociogenos de acuerdo con su estructura y procedencia puede ser la siguiente:

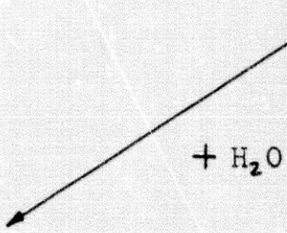
1-Ión Cianuro (CN^-). Este ión procede de glucosidos cianogeneticos como la amigdalina de las almendras (*Prunus amygdalus*) y la linamarina de la cassava (*Manict utilissima*). El ión cianuro se libera a partir de los glucosidos mediante una serie de reacciones catalizadas por en

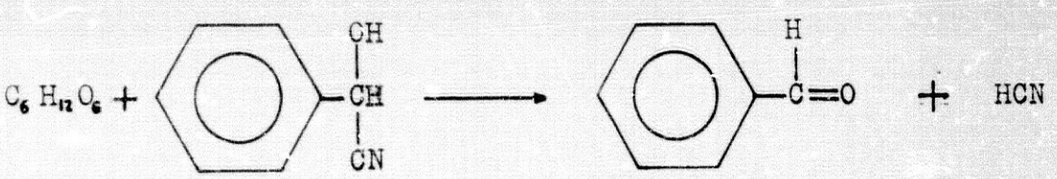
zimas contenidas en los tejidos vegetales y según el siguiente esquema:



Amigdalina

Mandelonitrilo glucósido





Mandelonitrilo Benzaldehido

El ión cianuro si se ingiere en concentraciones muy bajas como es el caso del consumo de cassava sometida a un tratamiento detoxicante, como el que realizan los pueblos centroafricanos y de sudamerica, da lugar a que en el organismo humano se transforme el ión cianuro, a nivel hepático, por acción de una enzima, la rodanasa, en SCN^-, ión mucho menos tóxico que el primero.

2-Derivados fenolicos. Estos derivados proceden de diversos glucosidos ampliamente distribuidos en la natura

leza y presentes en vegetales comestibles. La cascarilla del cacahuete (Arachis hypogea) contiene araquidosido que libera radicales fenolicos. Estos derivados fenolicos pueden ser iodados en el tiroides impidiendo la incorporación de iodo a la tirosina.

También se han identificado glucosidos similares en la nuez de acajou (Anacordium occidentale). Es posible que se contrarreste este efecto antitiroideo sin más que aumentar el aporte de iodo al organismo.

El bencil-tiocianato y el bencil-isotiocianato procedente de glucosidos hidrolizados enzimaticamente, parecen ser bociogenos frecuentes en algunos paises europeos en los que se consume como verdura la capuchina (Tropaeolum majus).

Con estructura quimica similar pero encontrando su utilización farmacologica en el tratamiento de úlceras varicosas debemos citar el resorcinol. Se comportan con mayor actividad antitiroidea aquellos componentes aromaticos con grupos hidroxilo en posición meta. Según señalan Green y col. (1977) estos derivados fenolicos, además de actuar de forma competitiva con la tirosina, son inhibidores de la peroxidasa, lo prueba al mismo tiempo que esta enzima puede actuar como modulador de las iodaciones organicas que tienen lugar en el tiroides.

3-Alquil-sulfuros.Tanto estos derivados organicos como los tioles correspondientes, son citados en la bibliografia como causantes principales del bocio endemico en algunos paises, como parece ser ocurre en el Libano, ya que el consumo de vegetales del genero Allium (ajo, cebolla, apio, etc.) parece ser frecuente y los componentes volatiles de estos vegetales estan constituidos fundamentalmente por moleculas organicas tales como n-propildisulfuros, entre otros muchos citados por Saghir y col. (1966).

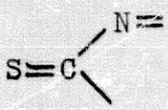
De igual modo, Schreyen y col. (1976) identifican más de 50 derivados azufrados en el puerro (Allium porrum).

Saghir y col. (1968) hacen referencia en un extenso trabajo a la acción inhibidora de la función tiroidea en ratas cuando se les administran diversos derivados disulfuros. En esta misma linea de trabajo Cowan y col. (1967) estudian la acción antitiroidea del metil-sulfuro, alil-disulfuro y el alil-sulfuro procedentes de la fracción volatil del aceite esencial del Allium cepa.

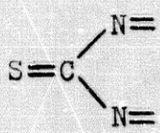
Trabajos realizados en Colombia por Gaitan y col. (1980) ponen de manifiesto la posible relación entre el bocio endemico existente en 37 localidades del valle oeste de Colombia y la contaminación del agua de bebida, aunque no determinan claramente los agentes bociogenos, suponen, de acuerdo con los trabajos realizados por este equi

po hasta el momento, que los microorganismos presentes en el agua producen una biodegradación de sustancias organicas hasta llevarlos al estado de alquil-sulfuros.

4-Tiourea y medicamentos derivados de ella. Los derivados de la tiourea y de la tionamida inhiben la organificación de los ioduros, siendo los más potentes los tioureilenos.



Tionamida



Tioureilenos

El mecanismo por el cual producen bocio se debe a que pueden inhibir la oxidación de varios sustratos actuando sobre las peroxidasas e impidiendo, por tanto, que en tejido tiroideo el ioduro pase a iodo. De esta forma la tirosina no puede iodarse y no se forman mono y diyodotirosina que son las que por reacciones de condensación oxidativa dan lugar a las hormonas tiroideas.

Esta acción no se inhibe con un aumento en la ingestión de iodo y solo puede paliarse con la administración de los productos finales, cuya sintesis esta impedida.

5-Compuestos aminoheterociclos. Las sulfonamidas se usan como drogas antidiabeticas, radicando su actividad bociogena en el grupo aminobenceno, pero desarrollando

una actividad antitiroidea más debil que los tioureilenos.

Las sulfamidas ejercen una acción antitiroidea perfectamente comprobada en experiencias con animales y no tan manifiesta en el ser humano debido fundamentalmente a la dosis relativamente elevada y prolongada que es precisa para que se manifiesten estos efectos. Según recoge Degroot en algunos trabajos parece que su efecto se debe a que las sulfamidas desplazan a la tiroxina de la proteina transportadora.

Las sulfonilureas presentan también actividad bociogena por el mismo mecanismo de acción que el anteriormente descrito para las sulfamidas.

6-Otros derivados organicos. Gran número de moleculas organicas utilizadas por su acción terapeutica en sindromes muy dispares pueden ejercer acción antitiroidea más o menos importante en la mayoria de los casos cuando se utilizan en tratamientos prolongados o en dosis excesivas.

Los nitrofenoles como el 2,4-dinitrofenol aumentan el consumo de oxigeno porque desacoplan la fosforilación oxidativa, pero no induce alteraciones importantes del metabolismo por efecto de la tiroxina. El dinitrofenol según Wolff y col. (1961) desplaza la hormona tiroidea del TBPA y a niveles medios de tiroxina se observa un aumento

de la misma en la bilis y hay una mayor excreción fecal de la citada hormona.

Los salicilatos aumentan de igual modo el consumo de oxigeno y posiblemente ocasionan una depresión de la función tiroidea. Aunque el mecanismo de respuesta no esta claro posiblemente se deba a una acción a nivel de la fosforilación oxidativa. Estos compuestos también ejercen una acción competitiva con la tiroxina a nivel de su unión con la TBPA y disminuyen los niveles plasmaticos de T_4. Esta hipotesis se ha sugerido por diversos autores como Musa y col. (1964) y Larsen (1972).

El fenobarbital causa un aumento del metabolismo de la hormona tiroidea a nivel de los microsomas hepaticos y en los animales reduce la efectividad biologica de la hormona. En los seres humanos la administración de fenobarbital, cuando los niveles de tiroxina estan disminuidos en un 25%, por ejemplo en enfermos con el sindrome de Graves, no parece ejercer una respuesta clinica apreciable.

7-Sales inorganicas. En la bibliografia consultada se pone de manifiesto la posible incidencia de gran número de iones inorganicos en la función de la glandula tiroidea. A alguno de estos iones se le achaca directamente una acción bociogena. A tal efecto el Ca^{++}, el NO_3^-, procedente de la dieta, el Br^-, F^-, Rb^+, y Co^{++} parecen ejer-

cer alguna acción. Todos estos efectos se han puesto de manifiesto claramente en animales de experimentación. No obstante, Day y col. (1972) ponen de manifiesto que una dieta rica en F^-, y con un aporte deficiente en iodo, como ocurre en algunas zonas de la India, pueden ocasionar una mayor incidencia del bocio.

El litio ejerce un importante y multifocal efecto en la fisiologia del tiroides. Cuando se tratan psicosis depresivas con sales de litio se ha visto que causa bocio y en ocasiones mixedema. El litio disminuye la relación entre la liberación de hormona tiroidea por la glandula y la degradación de tiroxina tanto en individuos hipertiroideos como en eutiroideos. A tal efecto el litio se ha usado en el tratamiento del hipertiroidismo tal como reseñan Berens y col. en un trabajo publicado en 1970.

En esta misma linea, cabe citar el efecto inhibidor de los yoduros sobre la sintesis hormonal, tal como indica Green. Una administración excesiva de yoduros a las ratas produce una inhibición en la producción de hormonas tiroideas que se conoce como efecto Wolff-Chaikoff. Si se administran dosis sucesivas y progresivas de iodo, los aportes modestos de iodo conducen a un aumento de las iodaciones hasta que llegado un momento comienzan a dismi

nuir. El mecanismo exacto de este fenomeno de Wolff-Chaikoff no es bien conocido, si bien, se postula que en la organificación de los ioduros interaccionen una serie de complejos intermedios y un exceso de ioduros podria bloquear las iodaciones.

8-Ión Tiocianato. El ión tiocianato es, asi mismo, un potente inhibidor del transporte de ioduros, y su tamaño molecular es similar al de los otros inhibidores del transporte. Se diferencia, no obstante, en:

- no aparece concentrado en el tejido tiroideo.
- es metabolizado activamente por el tiroides "in vivo" y en los preparados de celulas libres.
- el ión SCN^-, es un inhibidor de iodaciones organicas en concentraciones ligeramente mayores que las precisas para inhibir el transporte de yoduros.

Se ha pensado que el SCN^-, además de inhibir el transporte de ioduros, podria constituir un sustrato competitivo para la peroxidasa de ioduros tiroideos, y que explicaria tanto su biotransformación como su capacidad para inhibir las iodaciones. El tiocianato esta presente de ordinario en los fluidos del cuerpo y su concentración puede incrementarse en los fumadores según señalan los estudios realizados por Capelletti y col. (1982) y en nues

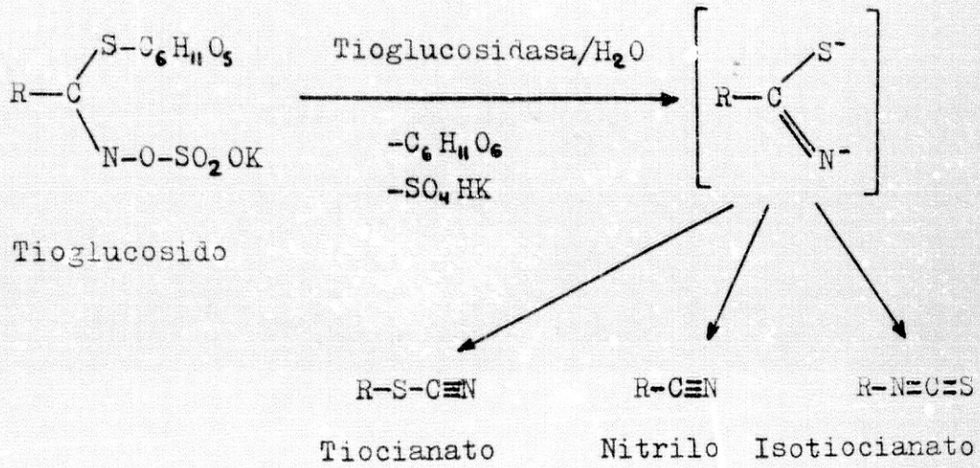
tro propio Departamento por Parras Masa y col. (1987)

Distribución del ión tiocianato en la naturaleza.

El ión tiocianato se encuentra en gran número de vegetales que forman parte frecuentemente de la dieta humana, asi como del pasto utilizado para alimentar algunos rumiantes que proporcionan leche en la alimentación humana. Se ha comprobado por los trabajos realizados por numerosos autores que la leche de vaca es un vehiculo indirecto e importante de SCN^-, en la dieta humana. Asi cabe citar los trabajos realizados por Iwarsson y col. (1973) e Iwarsson (1973), asi mismo, en nuestro Departamento por Augustin Campos y col. (1983) al determinar la presencia de ión SCN^-, en la leche de cabra consumida en la Alpujarra granadina.

El ión tiocianato es un componente importante en la composición de numerosas cruciferas, en todos los casos se encuentra formando parte de moleculas complejas, tioglucosidos, los cuales por acción de una tioglucosido hidrolasa se hidrolizan liberando diversos radicales entre los que cabe citar el tiocianato, isotiocianato y el nitrilo. En los vegetales de la dieta se encuentran gran cantidad de tioglucosidos, predominando siempre uño o dos

de ellos. La escisión se realiza cuando se produce una rotura de las celulas vegetales. Se han identificado multitud de tioglucosidos dandose la reacción de hidrolisis anteriormente descrita de la forma siguiente:



Los glucosidos que contienen al ión SCN^- en su estructura se encuentran en especies de la familia de las Cruciferas, aunque también se encuentran en las familias Capparaceae, Tovariaceae, Resedaceae, y Moringaceae.

Diversas variedades de coles comestibles pertenecientes al género Brassica tales como la coliflor (Brassica oleracea botrytis), el nabo (Brassica napus), la lombarda (Brassica oleracea var. capitata), el repollo (Cichorium intybus), etc. poseen glucósidos tiocianogeneticos que ejercen acción bociogena. La mayor parte de los glucosidos

identificados en vegetales, así como la parte del vegetal más rica en los mismos se cita en la siguiente tabla recogida por Lindner (1978).

PLANTAS EMPLEADAS COMO CONDIMENTO

Planta	Sustancia bociogena	Contenida en	Grupo caracteristico del aglucón R-
Allium cepa		Bulbos	Propildisulfuros, sus quimicas completas.
		Hojas	Alil-propildisulfuros, sust. quim.completas.
Armoracia lapatithifolia rusticana Rábano rusticano	Sinigrina Gluconasturtina	Bulbos	Alil- β-feniletil-
Brassica carinata Rábano etiope	Sinigrina	Semillas	Alil-
Brassica juncea	Sinigrina	Semillas	Alil-
Mostaza parda	Sinigrina	Semillas	Alil-
Brassica nigra Mostaza negra	Sinigrina	Semillas	Alil-
Sinapis alba Mostaza blanca	Sinalbina	Semillas	β-hidroxibencil-
Sinapis arvensis	Sinigrina	Semillas	Alil-

Son muy numerosos los trabajos realizados por diversos investigadores con el fin de valorar el SCN^- procedente de vegetales comestibles de la familia de las Crucíferas. En la mayoria de los casos se viene realizando este estudio por su relación con el bocio endemico. En este sentido Johnston y col. (1966) han determinado el contenido de tiocianato en diversas muestras del género Brassica. Incluso ponen de manifiesto la distribución de este ión en función del tejido vegetal analizado.

Neil y col. (1972) han determinado niveles de SCN^- en el rábano (Raphanus sativus) mediante la misma técnica colorimetrica despues de realizar una hidrolisis enzimatica de los glucosidos que contienen al citado ión.

McGregor (1978) encuentra niveles apreciables del ión SCN^- en el aceite extraido de la semilla de mostaza, asi como de la semilla de colza. Trabajos realizados por Daxenbichler y col. (1980) determinaron la presencia de SCN^- en chucrut por cromatografia. Hak-Yoon y col. (1980) determinaron la variación de ión tiocianato contenido en los cultivos de coliflor y brócoli (Brassica oleracea var. cauliflora).

Cappelletti y col. (1982) estudiaron la concentración en suero de tiocianato en personas fumadoras y no fumadoras, llegando a la conclusión de que la correlación

entre el tiocianato encontrado en suero y el número de cigarrillos diarios no esta confirmada. En un segundo trabajo Cappelletti y col. (1984) compararon la concentración de tiocianato en orina entre personas fumadoras y no fumadoras viendo que la excreción de tiocianato en orina es alta en los fumadores y no fumadores femeninos. También llegan a la conclusión de que no hay mucha correlación entre entre el número de cigarrillos por dia y la concentración en orina de tiocianato, especialmente en mujeres.

El número de trabajos que se vienen realizando por investigadores de diferentes paises para poner de manifiesto la presencia de glucosidos tiocianogeneticos, asi como, para la valoración de radicales de estos glucosidos como son las oxazolidintionas, el tiocianato, e isotiocianatos (n-butil, alil, y etilisotiocianatos) es muy elevado.

Asi, Youngs y col. (1967) han valorado mediante cromatografia gas-liquido y espectrofotometria U.V. los aniones antes citados en la semilla de colza. En todos los casos se liberan los aglucones que se detectan por las tecnicas analiticas citadas mediante hidrolisis enzimatica para lo cual se utiliza la enzima mirosinasa.

En harina de mostaza Josefsson (1968) ha determina-

do p-hidroxibencilisotiocianato a partir de obtener por hidrolisis enzimatica la muestra y medida colorimetrica a 460 nm tras adición de nitrato ferrico. El método da buen resultado y se aplico a la determinación de microcantidades.

Con posterioridad Andersen (1970) sigue un método de cromatografia gas-liquido (CGL) y determina el alil-isotiocianato presente en la semilla de mostaza y compara dicho método cromatografico con el método propuesto por la AOAC y llegan a la conclusión de que es más especifico y sensible.

Wetter y col. (1976) ponen de manifiesto la presencia de tioglucosidos en harinas de colza mediante una técnica de absorción en el U.V. con lo cual determinan el contenido en tiourea y oxazolidintiona procedente de la hidrolisis enzimatica de los tioglucosidos. Mullin y col. (1977) en esta misma linea de trabajo valoran el contenido de tioglucosidos a partir del ión SCN^- libre por acción enzimatica en diversas Cruciferas (coles de Bruselas, col, brócoli, coliflor, rábano, etc.).

En la col (Brassica oleracea) Daxenbichler y col. (1977) han determinado e identificado doce tioglucosidos existentes a partir de hidrolisis enzimatica de la muestra y utilización de la cromatografia gas-liquido con detec-

tor de ionización de llama, de modo que pueden identificar el radical organico. Hak-Yoon y cols. (1980) han determinado, siguiendo el método de Josefsson, la evolución en el contenido de tioglucosidos en dos clases de nabos, Brassica napobrassica y Brassica rapa. Bible y col. (1981) intentan relacionar la deficiencia de boro en la tierra de cultivo con el aumento de SCN^- contenido en el rábano (Raphanus sativus) de tal modo que la deficiencia de boro reduce el crecimiento de la planta mientras aumenta el contenido en SCN^- tanto en las hojas como en la raiz.

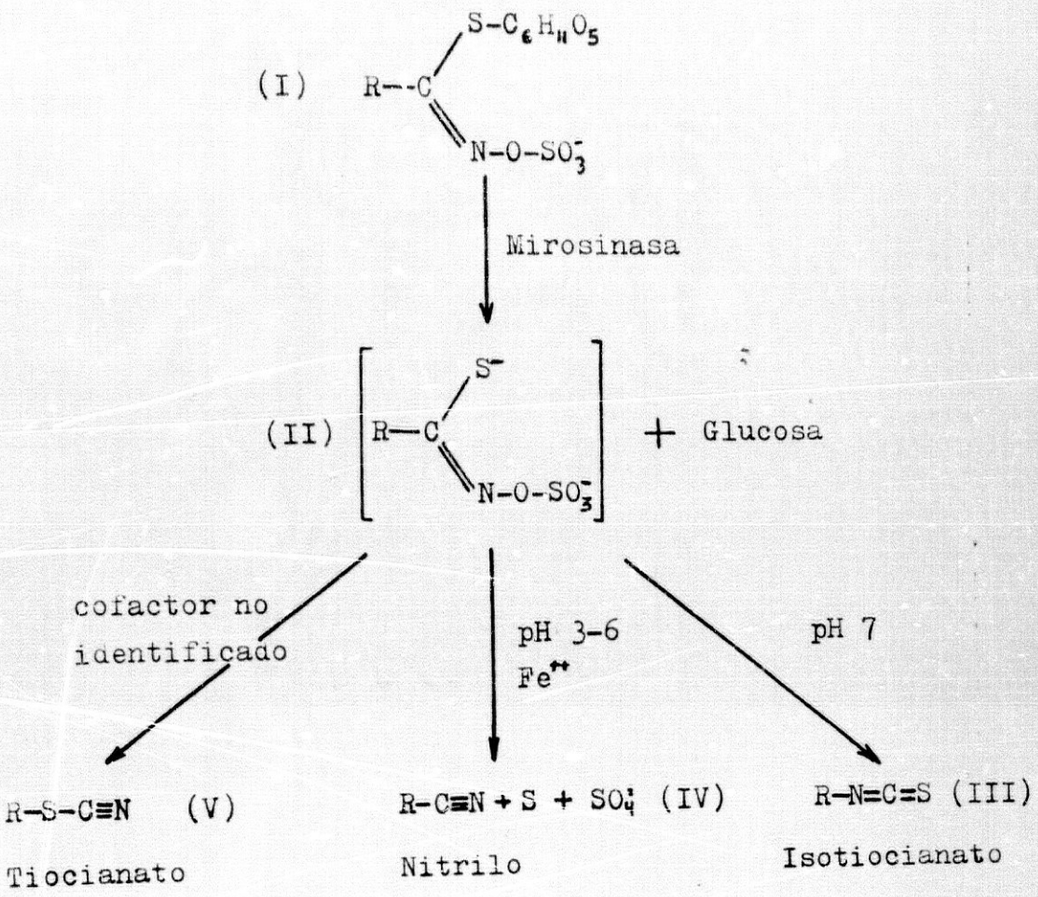
Otras fuentes importantes actualmente de SCN^- que se estan poniendo de manifiesto en el ser humano son los cigarros. En este sentido se han realizado estudios en diversos paises como es el caso de Heliövaara y col. (1981) que intentan relacionar la presencia de ión SCN^- en suero con la esperanza de vida en 15 años de un grupo de individuos con edades comprendidas entre 40 y 59 años. Llegan a la conclusión de que la presencia de este ión puede incidir de alguna manera en el cancer de pulmón de los fumadores y en procesos patologicos de las coronarias. En este mismo sentido Cappelletti y col. (1982 b) han realizado un amplio estudio y comparan grupos de fumadores y no fumadores y en todos los casos valoran en sueró los ni

veles de tiocianato. Encuentran niveles superiores de tiocianato en los individuos fumadores.

Hidrolisis enzimatica de los glucosido por la mirosinasa (EC 3.2.2.1.).

Los trabajos realizados hasta el momento para la determinación de ión SCN^- procedente de tioglucosidos, independientemente de la técnica analitica que se proponga para la determinación del ión una vez liberado en un medio apropiado, proponen la utilización de una enzima especifica, en todos los casos mirosinasa (EC.3.2.2.1), enzima que, al no encontrarse como producto comercial, debera obtenerse a partir de vegetales ricos en la misma. La técnica seguida generalmente es la propuesta por Schwimmer en 1961 quien publico un trabajo que permite con gran facilidad la obtención y valoración de mirosinasa.

Como materia prima se propone en este trabajo la mostaza amarilla (Sinapis alba) en polvo, obteniendose un rendimiento aproximado del 2%. Las reacciones de hidrolisis enzimatica que tienen lugar variaran según el pH y de unos determinados cofactores, tal y como señala McGregor y col. (1983) en el siguiente esquema:



En presencia de la enzima mirosinasa los glucosidos son hidrolizados, y según la naturaleza del glucosido, las condiciones de la reacción y los cofactores presentes en el tejido vegetal, algunos todavia no identificados, determinan los productos que se pueden formar.

Cuando se adiciona mirosinasa a una solución acuosa de un glucosido se libera glucosa y un aglucón muy reactivo (II). Ocurre que:

-si el pH es neutro se origina como producto de la reacción isotiocianato (III).

-cuando la disolución de mirosinasa es adicionada a un glucosido en solución, en medio acido, o en presencia de ión ferroso o nitrilo, se forma nitrilo y azufre (IV).

-un cofactor, todavia desconocido, puede producir la hidrolisis del glucosido dando tiocianato en lugar de isotiocianato (V).

Estos investigadores pretenden inactivar la enzima tioglucosido glucohidrolasa para evitar la hidrolisis de los tioglucosidos y para ello utilizan metanol, mezclas hidroalcoholicas, etc. con la finalidad de extraer los tioglucosidos para poder identificarlos y cuantificarlos.

La valoración de la enzima mirosinasa se basa en la hidrolisis del tioglucosido sinigrina por la enzima. La sinigrina absorbe a 227,5 nm y midiendo el decrecimiento de la absorbancia con el tiempo a esta longitud de onda podemos deducir la constante de Michaelis-Menten y la velocidad de la reacción para esta enzima. El producto de la reacción es, en su mayoria, alilisotiocianato, el cual no absorbe a 227,5 nm.

Caracteristicas quimicas y Métodos analiticos de determinación del ión Tiocianato.

El ión tiocianato es un ión neutro, incoloro, reductor, aunque reductores muy fuertes como es el cinc metalico en medio acido, lo descomponen en SH_2 y CNH. Todos los tiocianatos son solubles en agua, excepto los de Hg^{++} y Pb^{++}.

Forma complejos con diversos cationes, algunos de dichos complejos son coloreados, como el de Fe^{+++} (rojo intenso), el de Co^{++} (azul) y el de Bi^{+++} (amarillo). Entre los complejos incoloros conviene citar por su utilidad analitica el $Hg(SCN)_4^=$ que se utiliza como reactivo de cinc, cobre y cobalto.

La determinación del ión SCN^- a niveles de microcantidades supone utilizar tecnicas espectrofotometricas, espectrofluorometricas, o bien, cromatográficas, ya sea gas-liquido o más recientemente cromatografia líquida de alta presión.

1-Métodos Espectrofotométricos. Las tecnicas espectrofotometricas se basan generalmente en la medida de la absorbancia de complejos coloreados obtenidos a partir del ión SCN^- con iones metalicos o bien al desarrollo de

algún derivado despues de oxidar el ión SCN^- y condensar este producto de reacción con diversas moleculas organicas.

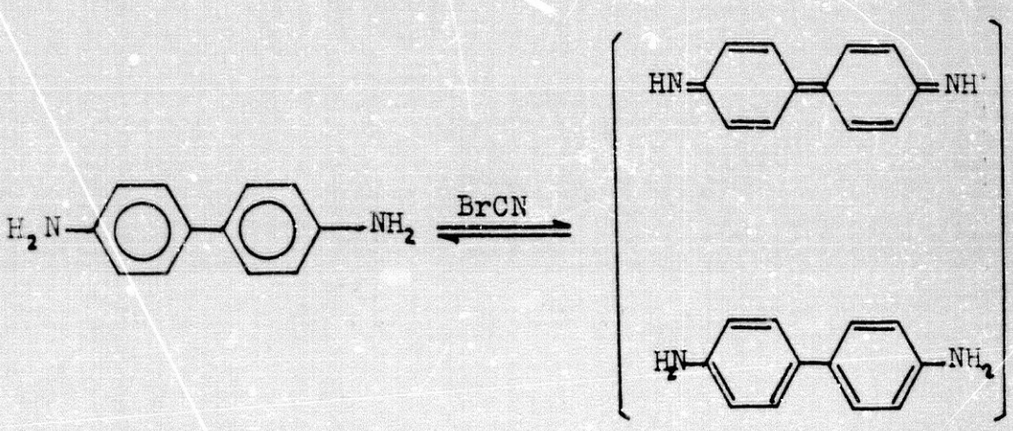
Entre los métodos colorimetricos se debe citar el basado en la reacción del ión tiocianato con el ión Fe^{+++} en medio nitrico. El complejo que se obtiene absorbe a 470 nm, longitud de onda a la que se realizan las medidas de absorbancia a fin de determinar la concentración de ión tiocianato. Williams W.J. (1979) indica que este método analitico se ve afectado por la interferencia de numerosos iones como el CN^-, Br^-, $C_2O_4^=$, $SO_4^=$,etc. Para eliminarlos, en algunos casos se acidula el medio convenientemente y por ebullición se puede eliminar, por ejemplo, el CN^- y otros iones como el $C_2O_4^=$ se eliminan por precipitación con Ca^{++}.

Josefsson (1968) propone un método para la determinación de SCN^- procedente de la semilla de Sinapis alba mediante la obtención del complejo tiocianato de hierro y mide la absorbancia a 460 nm. McGregor (1978) realiza una lígera modificación al método propuesto por Johnston y col. (1966) basado en utilización de mirosinasa para liberar el ión SCN^-.

Otros métodos colorimétricos se basan en la reac-

ción desarrollada por Aldridge en 1944 que consiste en la oxidación del ión SCN^- con bromo, obtención del bromuro de cianogeno, el cual oxida a la bencidina disuelta en piridina y se origina un derivado coloreado que absorbe a 525 nm. La reacción es la siguiente:

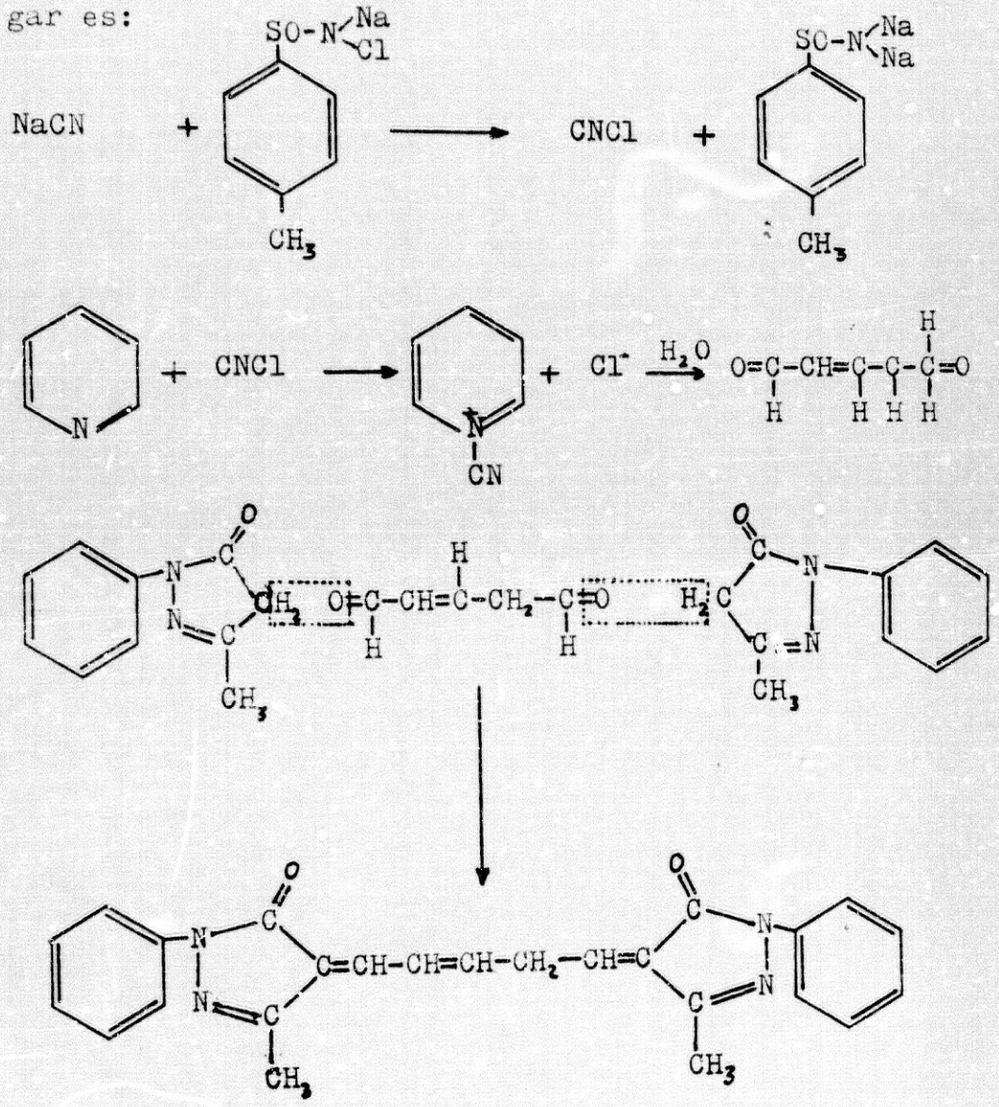
$$SCN^- + 4\ Br_2 + 4\ H_2O \rightleftharpoons SO_4^{=} + 7\ Br^- + BrCN + 8\ H^+$$



Este método ha sido modificado por Jimenez de la Higuera y col. (1985). En este caso se utiliza como agente oxidante, en lugar de solución saturada de bromo, una disolución de BrK y de BrO_3K que en medio ácido libera cuantitativamente bromo.

Epstein en 1947 desarrollo una técnica analitica que permitia la determinación de microcantidades de cianuro o bien tiocianato, mediante la oxidación de ión inorganico con cloramina T y posterior reacción del cloruro de ciano

geno con piridina-pirazolona, y asi se origina un derivado que absorbe a 630 nm. La reacción quimica que tiene lugar es:



Recientemente Nagashima (1984) realiza una revisión de esta técnica e introduce un nuevo agente oxidante en

la determinación de tiocianato, sustituye la cloramina T por cloramina B. Obtiene mejores resultados para la determinación de SCN^- siempre que no se pretenda la determinación simultanea con ión cianuro, en cuyo caso sigue siendo más adecuada la técnica inicial de Epstein.

Con posterioridad Kruse y col. (1953) propusieron una técnica colorimetrica que permite, asi mismo, la determinación de microcantidades de ión CN^-, o bien, ión tiocianato. En medio ácido, alcanzado mediante la adición de ácido sulfurico, se obtiene un complejo debido a la reacción del ión tiocianato con sulfato de cobre en piridina. Posteriormente se extrae el complejo con cloroformo y se realiza la medida espectrofotometrica de la absorbancia a 410 nm. Estos autores han realizado un estudio minucioso de las interferencias de aniones, tales como Br^-, NO_2^-, $C_2O_4^=$, BrO_3^-, F^-, etc. y proponen al mismo tiempo la forma de eliminar la posible interferencia. De igual modo realizan un estudio minucioso de la interferencia de numerosos cationes tales como Al^{+++}, Cd^{++}, Cr^{+++}, Co^{++}, Ni^{++}, etc. Proponen eliminar algunos de estos cationes, como el Ni^{++} y el Hg^{++} mediante el uso de resinas de intercambio ionico. Aplican esta técnica analitica a la determinación de los citados iones (SCN^- y CN^-) en aguas residuales de la industria.

Danchik y col. (1968) basandose en trabajos anteriores, y ya citados en la presente revisión, desarrollan un método espectrofotométrico de absorción atomica para la determinación indirecta de ión SCN^- , ya que obtienen un derivado de tiocianato con cobre-piridina. Tras la extracción selectiva con cloroformo determinan el cobre e indirectamente deducen la concentración de tiocianato con una sensibilidad de 0,05 ppm.

Como ya se viene refiriendo en este trabajo el ión SCN^- se encuentra en el suero del ser humano y aqui lo determinan Lundquist y col. (1979) mediante la oxidación de cianuro en medio ácido, oxidación con NaClO y posterior condensación del derivado con ácido barbiturico en piridina. Este método ha sido utilizado recientemente en nuestro Departamento por Parras Masa y col. (1987) on el fin de determinar SCN^- en suero de individuos sometidos a una dieta rica en Cruciferas.

En esta misma linea de trabajo Aubry y col. (1980) determinan el tiocianato en orina en individuos expuestos a derivados cianurados y en los resultados finales hacen una corrección para eliminar la interferencia de la creatinina como componente ordinario en orina que interfiere la coloración desarrollada por el tiocianato según el mé-

todo de Lundquist.

Como ya se viene indicando el ión SCN^- presente en medios biologicos procede de forma apreciable de la dieta de los individuos objeto de estudio, y en este sentido conviene señalar los estudios de Shuaib y col. (1981) que han trabajado con dos lotes de gallinas a una de las cuales dan una dieta rica en harina de colza y comparan el contenido de tiocianato en la yema de huevo. El método consiste, tras extraer el ión SCN^- de la muestra, en la formación de un complejo usando nitrato férrico como reactivo y siguiendo el método, ya descrito en esta revisión, de Johnston y col.

Abd El-Kader y col. (1984) han desarrollado un método espectrofotométrico que permite la determinación de diversos aniones como tiosulfato, tiocianato y tiourea usando como reactivo nitroprusiato sodico. De acuerdo con las condiciones del método logran hacer selectivo el método para cada uno de los iones citados. En el caso concreto del tiocianato proponen un pH aproximado de 4,8 y como medio dimetilformamida. En estas condiciones se origina un complejo coloreado que absorbe a 565 nm.

En resumen, a la vista de la bibliografia consultada referente a métodos espectrofotométricos se puede llegar a la conclusión que existen tres tecnicas analiticas

bien estudiadas y aplicadas por numerosos investigadores:

- una esta basada en la formación del complejo tiocianato de hierro en medio ácido y medida de la absorbancia a 460 nm.

- una segunda técnica consiste en la oxidación del ión tiocianato con cloramina T y posterior condensación del derivado con pirazolona en medio piridina y determinación de la absorbancia a 560 nm.

- y por último se ha utilizado ampliamente la oxidación del ión SCN^- con bromo y posterior reacción del bromuro de cianogeno con ácido barbiturico en piridina. Asi se obtiene un derivado que absorbe a 520 nm.

Existe, no obstante, algunas reacciones que sirven de base para métodos espectrofotométricos, asi como, modificaciones a los ya citados que han encontrado una aplicación más reducida, quiza debido, a la menor difusión de la técnica.

2-Métodos Cromatográficos. En cuanto a los métodos cromatográficos que se vienen utilizando para la determinación de tiocianato presentan un amplio campo, ya que existen técnicas basadas en cromatografia liquida (HPLC) que son métodos muy recientes y se viene utilizando tambien la cromatografia gaseosa (CGL), en cuyo caso es pre-

ciso, una vez aislado el ión tiocianato, transformarlos en derivados orgánicos suficientemente volatiles.

Asi, De Brabender y col. (1977) se basaron para la determinación del ión tiocianato por cromatografía gaseosa en la transformación del ión en bromuro de cianogeno por tratamiento oxidante con bromo. El BrCN formado es extraido con benceno y es analizado por cromatografía en fase gaseosa y con detector de captura de electrones.

Basandose en esta técnica, Shuaib y col. (1979) determinaron la cantidad de ión tiocianato libre contenido en el huevo de gallina. El procedimiento analitico seguido consistió, tras extraer el ión SCN^- del huevo previa desproteinización, centrifugación y filtración, en la bromación del ión tiocianato obteniendo el bromuro de cianogeno, el cual se extrae con benceno, y se inyecta en el cromatografo. Para la cuantificación analitica del bromuro de cianogeno adoptan como estandar interno el 2-bromopropano. Los limites de detección observados son de 0,005 $\mu g\ ml^{-1}$.

Con posterioridad Hirosue y col. (1983) determinaron el ión tiocianato presente en diversos alimentos como son verduras, frutas, hongos y especias. La técnica analitica seguida para la determinación del ión consistió,

al igual que la ya descrita por De Brabender y col., en obtener el bromuro de cianogeno por oxidación con bromo y extracción con benceno, para posteriormente, cuantificarlo por cromatografia en fase gaseosa con detector de captura electronica. Como estandar continuan proponiendo el 2-bromopropano. El procedimiento analitico seguido para liberar el tiocianato de los glucosidos en el tejido vegetal consiste sencillamente en una hidrolisis simple sin la adición de mirosinasa.

Funazo y col (1981) mediante cromatografia en fase gaseosa determinan iones inorganicos tales como CN^-, $S^=$, SCN^-, I^-, Br^-, etc. previa metilación y compara el rendimiento de diversos agentes metilantes como $SO_4(CH_3)_2$, $PO_4(CH_3)_3$ y el metil-para-toluensulfonato, obteniendo mayor rendimiento en el caso del SCN cuando se usa el dimetil sulfato. Además compara la sensibilidad de la técnica cromatografica en función al detector empleado. Obtienen buena resolución con el detector de ionización de llama (FID) pero para los niveles en que algunos de estos aniones pueden encontrarse en algunos fluidos biologicos aconsejan el uso del detector de captura de electrones (ECD), al ser más sensible para algunos de los iones estudiados como son el SCN^- y el I^-.

La determinación de iones inorganicos cuando se encuentran a niveles de ppm. se ha resuelto en numerosas ocasiones mediante separación cromatografica con resina de cambio ionico. Esta tecnica va evolucionando hasta llegar a la cromatografia líquida de alta resolución. Basandose en este proceso Igawa y col (1981) proponen un método de separación de aniones utilizando una resina Amberlyst 21 y proponen un detector conductimétrico. Asi separan y determinan los iones I^-, Cl^-, F^-, SCN^-, y NO_3^-.

Una técnica similar es la seguida por Ayers y col. (1984), pero el detector ensayado es una fuente UV realizando las medidas a 200 nm. Asi determinan Cl^-, Br^-, SCN^-, $S_2O_3^=$, BrO^-, $SO_4^=$, etc. Los límites de detección para el SCN^- es de 5 ng.

Comportamiento de la Glandula Tiroidea y de los Agentes Bociogenos.

La glandula tiroides secreta dos hormonas importantes, la tiroxina y la triyodotironina. El tiroides esta compuesto por una serie de foliculos cuyo constituyente principal es la tiroglobulina que contiene las hormonas tiroideas. Para que las celulas del tiroides puedan pro-

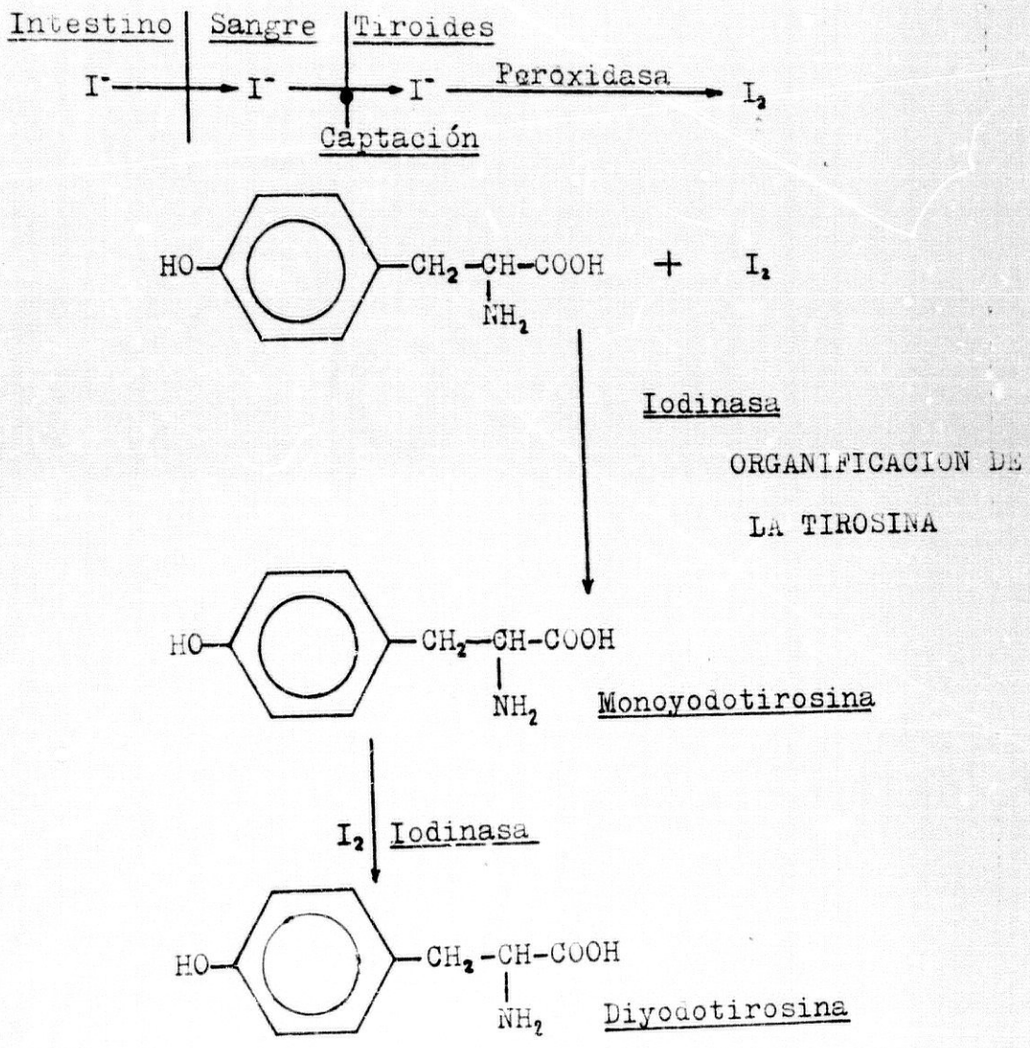
ducir en condiciones y cantidades normales las hormonas tiroideas es preciso un aporte de iodo de aproximadamente 1 mg por semana. Una vez absorbido el ioduro en el intestino, por el mismo mecanismo de transporte que el cloruro, llega a las células tiroideas las cuales tienen capacidad específica para transportar activamente el ión ioduro a su interior. Una posterior etapa esencial de este proceso de sintesis de las hormonas tiroideas es la oxidación del ión ioduro a iodo, que es capaz de combinarse directamente con el aminoácido tirosina.

Esta oxidación del iodo es promovida por la enzima peroxidasa. La unión del iodo con la molecula de tirosina se denomina organificación de la tiroglobulina. La tirosina es primero iodurada a monoyodotirosina y despues a diyodotirosina. En seguida, en las células tiroideas, se acoplan entre si los restos de yodotirosina y el resultado del acoplamiento es la tiroxina (T_4) cuando lo hacen dos moleculas de diyodotirosina y se obtiene triyodotironina (T_3) si los que se acoplan son una molecula de monoyodotirosina y una molecula de diyodotirosina. Es decir:

Monoyodotirosina + Diyodotirosina ⟶ Triyodotironina (T_3)

Diyodotirosina + Diyodotirosina ⟶ Tiroxina (T_4)

Una vez sintetizadas se almacenan durante periodos prolongados de tiempo en los foliculos de las celulas tiroideas junto con la hormona tiroglobulina.



Cuando se liberan estas hormonas pasan a sangre y son transportadas por las proteinas plasmaticas. Las hormo

nas tiroideas tienen dos efectos importantes:

-aumentan el índice metabolico total.

-estimulan el crecimiento de los niños.

En el presente trabajo ya se ha definido el concepto de bocio endemico y el de sustancias bociogenas, siendo ya enumeradas cuantas sustancias bociogenas se conocen por la bibliografia consultada. No obstante, numerosos trabajos analizan las causas del bocio endemico, asi como, del mecanismo por el cual actuan las sustancias bociogenas. En esta misma linea de trabajo Rodriguez Poyo-Guerrero y col (1985) indican como factor más importante, aunque no el único, la deficiencia de iodo como causa del bocio endemico. Señalan también numerosos compuestos que por su ingestión producen un efecto bociogeno según diversos mecanismos y que se exponen en la Tabla II.

En relación con los fármacos antitiroideos señalan que el metimazol, carbimazol, propiltiouracilo, etc. si se emplean a dosis elevadas en la gestante hipertiroidea pueden provocar hipotiroidismo o bocio en el recien nacido debido a que atraviesan la barrera placentaria.

Señalan también que mientras el efecto bociogeno del SCN^- en el tiroides puede ser contrarrestado con ur mayor aporte de iodo (al ser un mecanismo de competencia por el transporte) dicho aporte de iodo no soluciona, sin embargo,

TABLA II.

Bociogenos	Mecanismo de acción
Alimentos.	
Plantas gen. Brassica.	Inhibición captación.
(col, coliflor, nabo, etc)	Inhibición organificación.
Nueces	Inhibición captación.
	Inhibición organificación.
Mandioca, linaza.	Inhibición captación.
Aceites vegetales (soja)	Aumentan eliminación fecal de iodo.
Minerales.	
Calcio, Litio, Fluor.	Inhibición captación.
Cobalto.	Inhibición organificación.
Iodo (dosis elevadas)	Inhibición de la liberación y sintesis hormonal.
Agua potable contaminada por E. coli, etc.	?
Fármacos antitiroideos.	
Carbimazol, Metimazol, etc.	Inhibición organificación.
	Inhibición acoplamiento.
Propiltiouracilo.	Bloquea la transformación periferica de T_4 a T_3.

los casos de bocio debido a las oxazolidintionas ya que actuan en la organificación del iodo, por lo tanto, en un nivel tardio de la sintesis hormonal.

Con referencia a la visión de conjunto que se ha hecho en cuanto a la sintesis de las hormonas tiroideas, asi como, a la inhibición de estos procesos por los diversos agentes bociogenos se debe citar el trabajo de Velden y col. (1973) que han realizado ensayos con diversos lotes de ratas a los que se administra cassava con un contenido medio de 1,6 mg de ión CN^- procedente de glucosidos cianogeneticos, y al otro lote de animales les dan entre 1-2 mg de SCN^-. Estudian los efectos de estos iones sobre el metabolismo del iodo en el tiroides y observan un efecto similar sobre la sintesis de hormonas tiroideas en los dos casos, además hay una reducción significativa en el plasma del complejo iodo-proteina transportadora.

Asi mismo, comprueban que si en la dieta se proporcionan unos 10 µg de ioduro se corrigen la mayor parte de las alteraciones. En este mismo trabajo se hacen referencia a las investigaciones de diversos autores tales como Rosenthal y Lang, entre otros, los cuales indican que el CN^- absorbido a nivel gastrointestinal se convierte rapidamente en SCN^- por un mecanismo enzimatico en el cual inter

viene una sulfotransferasa.

Virion y col. (1980) han puesto de manifiesto "in vitro" los efectos que ejerce la presencia de ión SCN^- en la sintesis de las hormonas tiroideas. Han comprobado que la lactoperoxidasa, enzima que oxidaria el ioduro a iodo, tambien tiene capacidad para oxidar el SCN^-, y en consecuencia se originaria una reacción secundaria que impediria la utilización del ioduro plasmatico por la glandula tiroidea, pero por otra parte, han comprobado que niveles de 1 μM de SCN^- estimulan la reacción de acoplamiento en la sintesis de hormonas tiroideas.

El efecto bociogeno de la semilla de colza es debido a su alto contenido en oxazolidintiona y otros tioglucosidos ha sido estudiado y puesto de manifiesto claramente por Iwarsson y col. (1973) los cuales han administrado a un lote de ganado vacuno una dieta a base de semilla de colza y comparan su efecto sobre la glandula tiroidea con otro grupo de animales a los que alimentan con semilla de soja. Llevan un control estricto de las proteinas séricas, el valor hematocrito, hierro en suero, hemoglobina, etc. durante toda la experiencia y por último realizan un estudio histologico de la glandula tiroidea y llegan a la conclusión de que los animales presentan una glandula dos ve-

ces mayor que el grupo control. Con este crecimiento pretende compensar el bloqueo en la sintesis hormonal causado por los tioglucosidos.

Cuando intentan relacionar esta experiencia con el aporte en iodo en la dieta, incluyendo en la misma sal iodada, observan que el aporte de iodo a esos niveles no tiene capacidad para evitar la anormalidad de la glandula.

O B J E T I V O S

En el trabajo experimental objeto de esta Memoria de Licenciatura se pretende la puesta a punto de una técnica por cromatografía en fase gaseosa con detector de captura de electrones que permita el analisis cuantitativo del ión SCN^- procedente de muestras naturales.

Este trabajo forma parte de un amplio Proyecto de Investigación con el que se pretende el estudio de los agentes bociogenos procedentes de la dieta que puedan incidir en el bocio endemico de la Alpujarra granadina.

La finalidad es disponer de una técnica analitica versatil para la determinación del SCN^- contenido en alimentos y que a continuación nos permita analizar dicho ión en líquidos biologicos (orina y suero) de individuos que vivan en zonas de bocio endemico.

II. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

II.1. INSTRUMENTAL

Pesadas

Las pesadas de los distintos productos se han realizado en balanza electrica, marca Mettler tipo H-10 de sensibilidad 5.10^{-4} g.

Espectrofotometria

Para realizar las diferentes médidas se ha utilizado un espectrofotómetro UV/V marca Perkin-Elmer, modelo 551 S. Para las medidas se han utilizado cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Centrifugación

Se ha utilizado una centrifuga marca Heraeus, modelo universal Junior IS.

Destilación

Para la destilación se ha utilizado un rotavapor

II.2. REACTIVOS

-Acetato sódico P.A., Merck

-Acetona P.A., Quimon

-Acido acético P.A., Merck

-Benceno P.A., Merck

-Dimetilsulfato P.A., Merck

-Hidroxido sódico P.A., Probus

-Mostaza amarilla, Ceylan

-Sinigrina, Janssen

-Tiocianato de etilo P.A.,Merck

-Tiocianato de metilo P.A., Merck

-Tiocianato potasico P.A., Merck

II.2.1. Disoluciones empleadas

Disolución de sinigrina 0,21 mM

8,94 mg de sinigrina se llevan a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Disolución de mirosinasa 0,135 mg/ml

1,8[illegible] mg de mirosinasa se completa hasta 10 ml con agua

marca Buchi, modelo R 110.

Cromatografia

Para el análisis cromatográfico se ha utilizado un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, modelo Sigma 3B, con una columna Porapak P y utilizando un detector de captura de electrones. Asi mismo, se utilizó un integrador computador Perkin-Elmer, modelo Sigma 15.

Material accesorio

Se ha utilizado material de vidrio habitual.

Desecación

Para la desecación de las muestras se ha usado una estufa Heraeus Hanau, tipo RT 360.

II.2. REACTIVOS

-Acetato sódico P.A., Merck

-Acetona P.A., Quimon

-Acido acético P.A., Merck

-Benceno P.A., Merck

-Dimetilsulfato P.A., Merck

-Hidroxido sódico P.A., Probus

-Mostaza amarilla, Ceylan

-Sinigrina, Janssen

-Tiocianato de etilo P.A.,Merck

-Tiocianato de metilo P.A., Merck

-Tiocianato potasico P.A., Merck

II.2.1. Disoluciones empleadas

Disolución de sinigrina 0,21 mM

8,94 mg de sinigrina se llevan a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Disolución de mirosinasa 0,185 mg/ml

1,85 mg de mirosinasa se completa hasta 10 ml con agua

destilada.

Disolución patrón de tiocianato de metilo 10^{-3} g/l.

0,1 mg de $SCNCH_3$ se llevan a 100 ml con benceno.

Disolución patrón de tiocianato de etilo 10^{-3} g/l.

0,1 mg de $SCNC_2H_5$ se llevan a 100 ml con benceno.

Disolución patrón de $SCNC_2H_5$ utilizada como estandar interno.

2,5 mg de $SCNC_2H_5$ se llevan a 50 ml con benceno. De esta disolución se toman 50 µl que se agregan a cada muestra como estandar interno.

II.2.2. Preparación del enzima tioglucosido glucohidrolasa (Mirosinasa, EC. 3.2.2.1.).

1.-Obtención de mirosinasa.

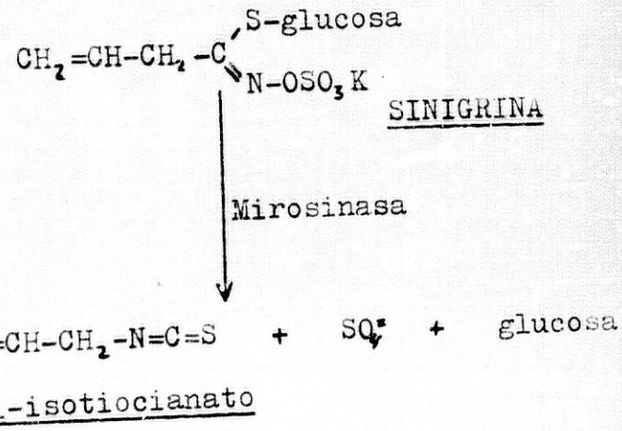
En este trabajo se ha utilizado como agente para liberar el ión SCN^- de los glucosidos, contenidos en los vegetales analizados, una enzima hidrolitica que se ha obtenido a partir de mostaza amarilla en polvo (Sinapis alba), y se ha seguido la técnica, ya citada en la revisión bibliográfica, de Schwimmer (1961):

100 g de mostaza en polvo se trata 10 veces con 300 ml de acetona cada vez. El residuo desengrasado se deseca al vacio hasta eliminación total del disolvente. El polvo asi obtenido se lava dos veces con 300 ml de agua, se separa el sobrenadante mediante centrifugación y esta fracción acuosa se va fraccionando con acetona. La porción precipitada cuando la riqueza de acetona esta comprendida entre el 30-70% se somete a dialisis en agua por un periodo de 41 horas. El producto, asi obtenido, esta constituido primordialmente por mirosinasa (EC. 3.2.2.1.) y se conserva mediante liofilización.

2.-Valoración de mirosinasa.

Para ello se ha seguido igualmente el método propuesto por Schwimmer (1961). Se valora frente a un sustrato específico, la sinigrina, que por acción de la mirosinasa libera cuantitativamente alil-isotiocianato. La sinigrina presenta un máximo de absorbancia a 227.5 nm, mientras que el producto de hidrolisis, alil-isotiocianato, no absorbe a la citada longitud de onda. En consecuencia, el decrecimiento de la absorbancia a 227.5 nm se puede atribuir a la desaparición de la sinigrina.

El proceso hidrolitico es:



La adición de mirosinasa a una disolución de sinigrina a pH 6 ocasiona una rápida disminución de la absorbancia a

227.5 nm. El proceso es practicamente lineal tal como se puede deducir del cálculo de la constante de Michaelis-Menten.

La técnica consiste en preparar disoluciones con volumenes crecientes entre 0,50 y 1,5 ml a partir de una disolución de sinigrina 0,21 mM. Se regula el pH con disolución reguladora de acetico-acetato hasta un valor de 6, e inmediatamente se adiciona 1 ml de disolución de mirosinasa 0,185 mg/ml.

Se realiza la lectura de la absorbancia a 227.5 nm por un período de tiempo comprendido entre 0-2 horas. Se comprueba una disminución constante y practicamente lineal de la absorbancia inicial del sustrato.

Con los valores de absorbancia leidos se procede al cálculo de la velocidad de catalisis a diferentes concentraciones de sustrato. La ecuación utilizada para estos cálculos es:

$$\text{Vel. de reacción (M/ml/min)} = \frac{\text{Abs/min} \cdot V}{E_{227'5} \cdot b \cdot v}$$

siendo:

v = volumen de la cubeta.

V = volumen de la disolución empleada.

$E_{227'5} = 7800\ M^{-1}\ cm^{-1}$

b = espesor de la cubeta

Las velocidades de hidrolisis obtenidas fueron:

[S]	1/[S]	V (M/ml/mi)	1/V
0,0500 mM	20,00 mM^{-1}	2,36 10^{-6}	0,42
0,0807 mM	12,38 mM^{-1}	4,16 10^{-6}	0,24
0,1016 mM	9,84 mM^{-1}	5,36 10^{-6}	0,18

La constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima se pueden derivar de las velocidades de catalisis ya calculadas, y para ello se aplica la siguiente ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max.}} + \frac{K_m}{V_{max.}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

obteniendose como valor de la $K_m = 5,04 \cdot 10^{-2} M$

II.3. DETERMINACION DE SCN^- POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA

II.3.1. Ensayos previos para la determinación de SCN^-.

El ión tiocianato es posible determinarlo por CGL con detector de ionización de llama (FID) o con detector de captura de electrones (ECD), pero en todos los casos es preciso transformar la molecula inorganica en un derivado volatil a fin de que dé una respuesta adecuada frente a los detectores citados.

Se han realizado varios ensayos para transformar el ión SCN^-. Asi mediante la reacción de oxidación citada por Hirosue y col. (1983) el ión tiocianato es oxidado con bromo en medio ácido generandose BrCN.

Bajo las condiciones de trabajo siguientes:

-Columna: columna Porapak Q.

-Programación:

Temperatura bloque inyección	250ºC
Temperatura bloque detector	300ºC
Temperatura horno	160ºC

-Gas portador: nitrogeno con un flujo de 20 ml/minuto.

-Volumen de inyección: 1 µl

se obtienen cromatogramas como el correspondiente a la Figura 1.

Esta técnica analitica no ha sido considerada de

gran interés debido a que es tediosa y requiere el empleo de reactivos tales como el Br_2 , cuya manipulación es compleja.

Otra técnica analitica ensayada ha sido la propuesta por Funazo y cols. (1981) en cuyo caso se procede a la metilación del SCN^- del siguiente modo:
A 1 ml de disolución 10^{-1} M de SCNK se adicionan 50 µl de $SO_4(CH_3)_2$ y se mantiene en baño de agua a 65ºC durante 30 minutos. Una vez frio se adiciona 1 ml de benceno que extraera el $SCNCH_3$, y de esta disolución, se inyecta 1 µl en el cromatografo.

El cromatograma obtenido utilizando ECD corresponde a la Figura 2.

Tanto el BrCN como el $SCNCH_3$ dan respuesta con el detector de ionización de llama (FID) , pero la sensibilidad de este detector para los derivados citados es menor que con el ECD. En consecuencia se procedera a estudiar detenidamente la reacción de metilación del SCN^- y su comportamiento cromatografico con ECD.

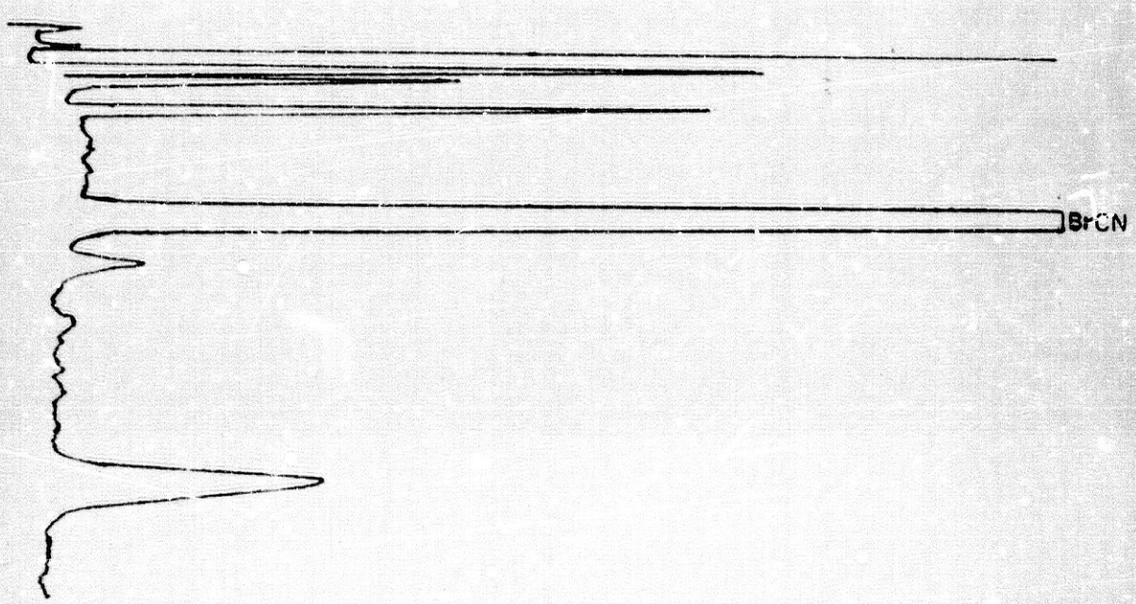


FIGURA 1.- Cromatograma del derivado (BrCN) obtenido en la bromación del ión SCN^-.

II.3.2. Analisis Cualitativo

Para conocer el tiempo de retención corregido del tiocianato de metilo se preparó una disolución de concentración 10^{-3} g/l en benceno. En las condiciones indicadas:

-Columna: columna de acero inoxidable de 2 metros rellena de Porapak P 80/100.

-Programación:

Temperatura bloque inyección	250ºC
Temperatura bloque detector	300ºC
Temperatura horno	145ºC

-Gas portador: nitrogeno con un flujo de 24 ml/minuto. Flujo gas auxiliar detector de 40 ml/minuto.

-Volumen inyección: 1 µl.

En estas condiciones se obtuvo el cromatograma de la Figura 3.

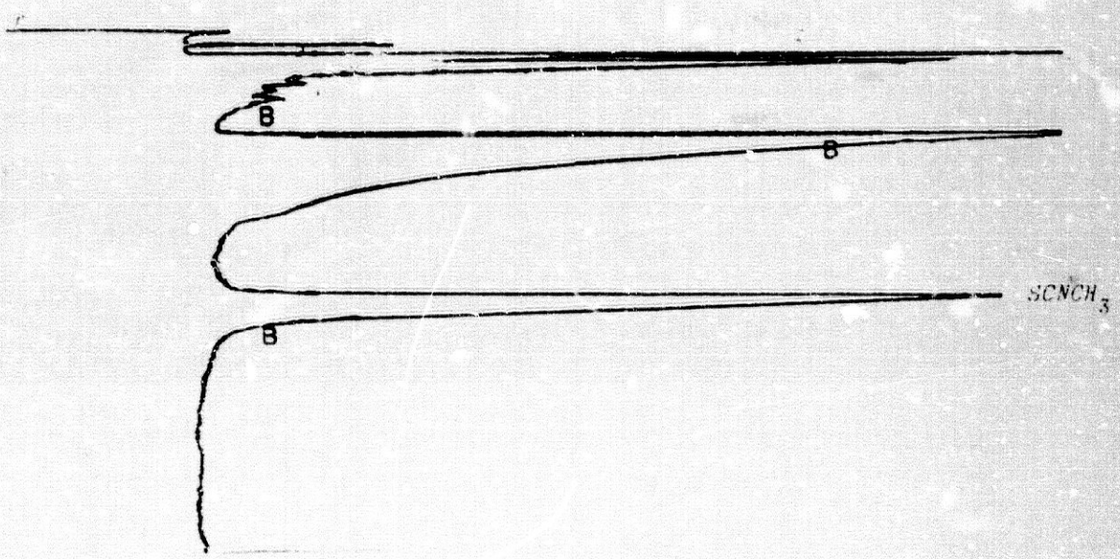


FIGURA 3 .- Cromatograma de disolución patrón de concentración 10^{-3} g/l , de $SCNCH_3$.

II.3.3. Analisis Cuantitativo

En cromatografia de gases existen diversos métodos para efectuar un analisis cuantitativo:

-Normalización interna.

-Patrón interno.

-Patrón externo.

Se ha elegido el método del patrón interno ya que elimina la influencia de factores externos en el resultado, además de ser más exacto que los otros ya citados.

II.3.3.1. Método del Patrón Interno

En el método del patrón interno, se mezclan, en concentraciones conocidas, la sustancia problema con un compuesto no contenido en ella y elegido de manera que en las condiciones de trabajo el pico correspondiente no se solape con otro de la muestra.

El patrón interno debe, además, cumplir las siguientes condiciones:

-no encontrarse en el problema que se desea analizar.

-tener similitud con los componentes del problema.

-su concentración debe ser lo más aproximada posible a

la de los componentes de la muestra.

-eluir en un tiempo cercano al de los componentes del problema.

En consecuencia, se ha elegido como patrón interno el tiocianato de etilo. Se comprobó la pureza analitica de este reactivo para asegurar, sobre todo, la no existencia de $SCNCH_3$.

Para el desarrollo metodologico del patrón interno podemos considerar dos apartados:

1-Calculo del factor de respuesta.

El calibrado es el proceso en el que concentraciones conocidas de los componentes de interés, se mezclan con una cantidad conocida de patrón interno para obtener áreas que nos permitan calcular factores de respuesta del detector con la sustancia de la mezcla problema.

En las condiciones cromatograficas elegidas para realizar el analisis de una mezcla del componente puro i y el patrón o , cuyos pesos son respectivamente P_i y P_o , se obtiene un cromatograma en donde A_i es el área correspondiente al componente i y A_o la del patrón interno o.

En esas determinadas condiciones podemos obtener el factor de respuesta f(i) del componente i respecto al patrón o mediante la siguiente ecuación:

$$f(i) = \frac{P_i \ / \ P_o}{A_i \ / \ A_o} = \frac{P_i \ A_o}{P_o \ A_i}$$

2-Determinación del componente i.

Para determinar la concentración de un componente i (en este caso $SCNCH_3$) en una muestra se añade a una cantidad de la misma Pm, un peso determinado de patrón interno P_o' y se obtiene el cromatograma correspondiente donde el pico del componente i tiene un área A_i' y el del patrón un área A_o' .

Actuando en las mismas condiciones experimentales que cuando se calcula f(i) se cumplira que:

$$f(i) = \frac{P_i' \ A_o'}{P_o' \ A_i'}$$

despejando P_i' podemos obtener la concentración.

TABLA IV

	Mezcla I	Mezcla II	Mezcla III
A_i	3.0744	1.9807	0.0737
	2.8504	2.1848	0.1781
	2.9451	2.0867	0.0949
	3.3172	2.0764	0.1084
	3.0857	2.0853	0.2031
	—	—	—
A_o	3.1022	4.0844	3.1179
	2.9024	4.2240	3.2128
	3.0100	4.0734	2.8344
	3.1797	3.9124	2.8689
	3.1155	4.0699	2.9673

Hallando los valores medios de A_o y A_i y relacionandolos con los P_o y P_i mediante la formula para el cálculo del factor de respuesta se obtiene el f(i) correspondiente al tiocianato de metilo tal como se indica en la Tabla V.

TABLA V

	MEZCLA I	MEZCLA II	MEZCLA III
P_i	10.10^{-7}	5.10^{-7}	1.10^{-7}
P_o	25.10^{-7}	25.10^{-7}	25.10^{-7}
$\bar{A}_i$	3.0546	2.0827	0.1316
$\bar{A}_o$	3.0616	4.0748	3.0003
	—	—	—
P_i / P_o	0.4	0.2	0.04
$\bar{A}_i / \bar{A}_o$	0.9977	0.5110	0.0438

Los valores de la Tabla V se han utilizado para calcular la ecuación de la recta correspondiente a la grafica de la Figura 4.

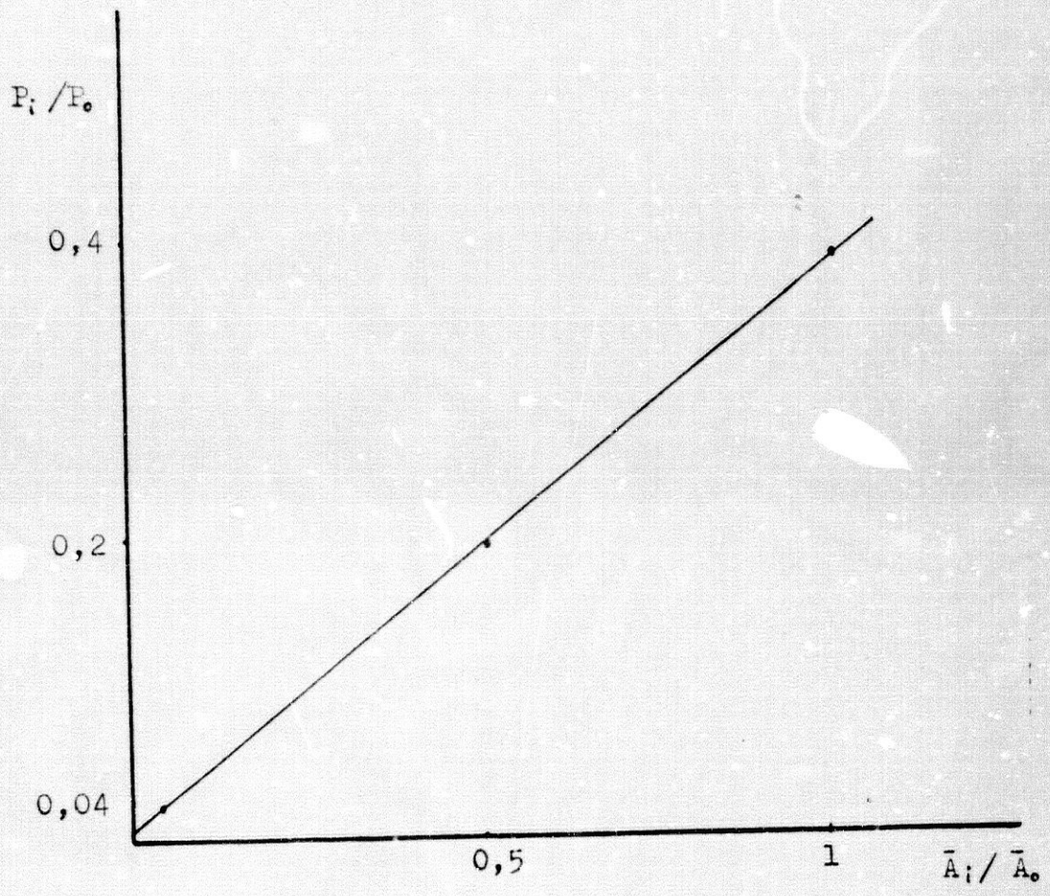


FIGURA 4 .- Representación de la ecuación de la recta para el cálculo del factor de respuesta del $SCNCH_3$.

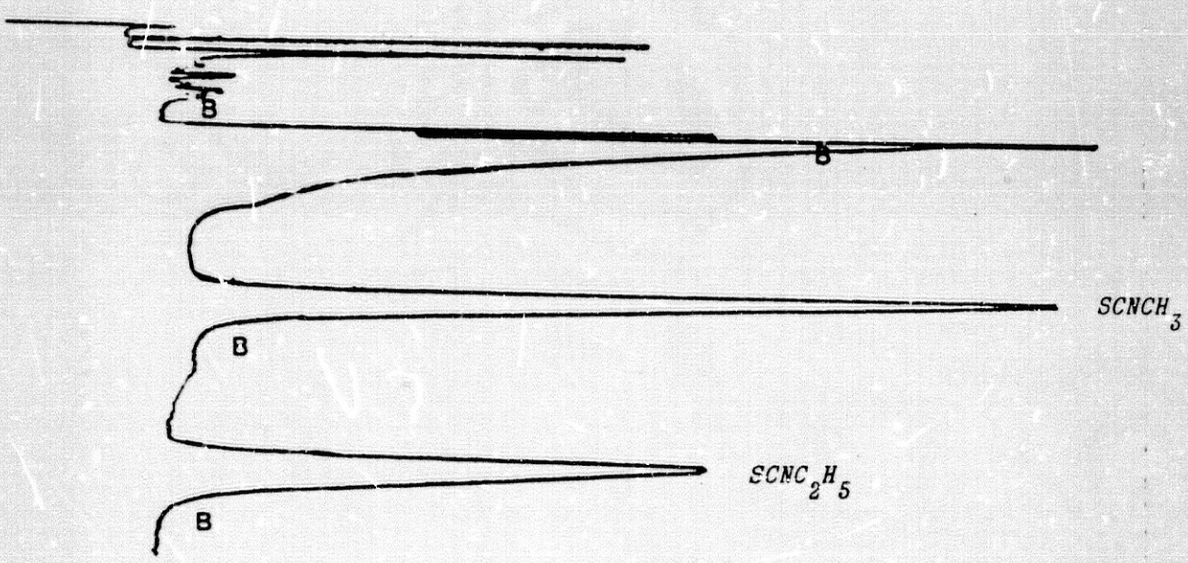


FIGURA 5.- Cromatograma para el cálculo del factor de respuesta del $SCNCH_3$ para concentración de 10^{-3} g/l.

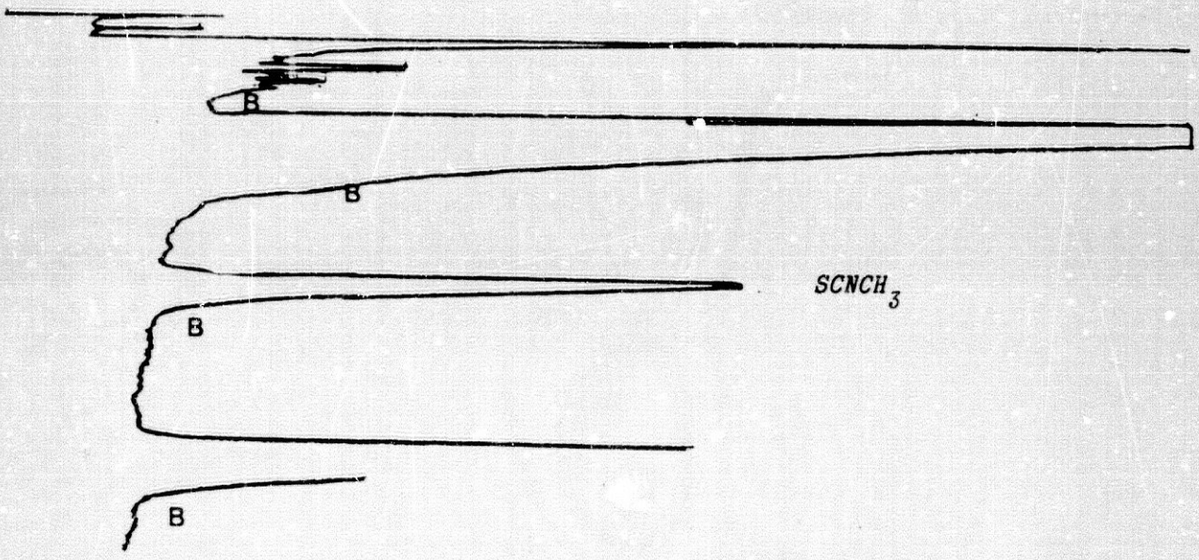


FIGURA 6 .- Cromatograma para el cálculo del factor de respuesta del $SCNCH_3$ para concentración de $5 \cdot 10^{-4}$ g/l.

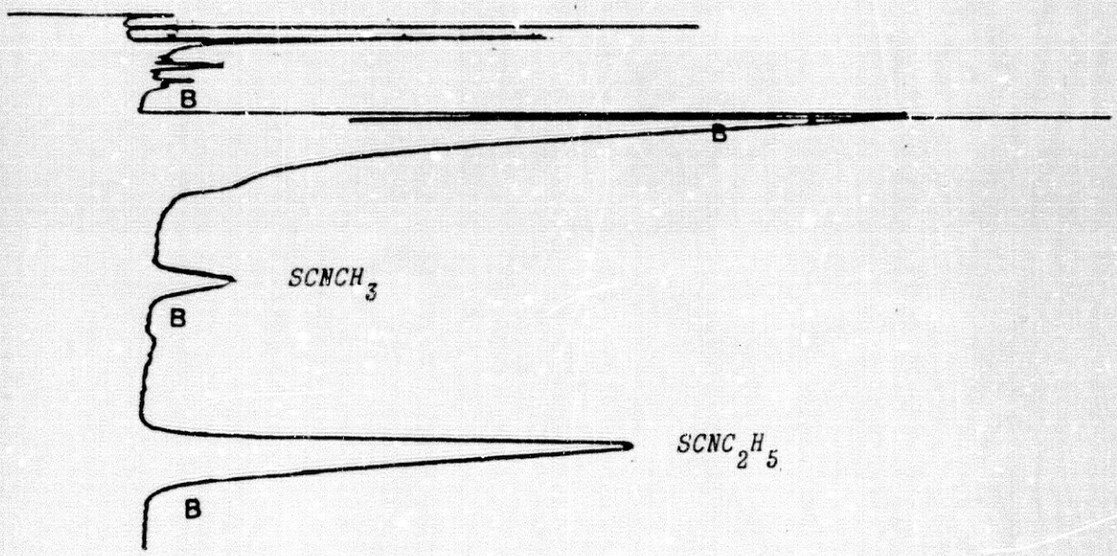


FIGURA 7 .- Cromatograma para el cálculo del factor de respuesta del $SCNCH_3$ para concentración de 10^{-4} g/l.

II.3.5. Interferencia del reactivo metilante.

La reacción de metilación se puede llevar a cabo en frío, pero el exceso de reactivo metilante (dimetilsulfato) produce saturación del detector. Para evitar esta interferencia se ha procedido a la eliminación del exceso de reactivo mediante la elevación de la temperatura durante el proceso de metilación.

Los ensayos realizados obtenidos tras la metilación del SCN^- originan cromatogramas (Figura 8) en los que se observa el pico correspondiente al exceso de $SO_4(CH_3)_2$. Para evitar esta interferencia se procede a la metilación de disoluciones 10^{-3} g/l de SCN^- las cuales se calientan en baño de agua a 65ºC durante 30 minutos. Bajo estas condiciones se mantiene practicamente constante la concentración de $SCNCH_3$ mientras el exceso de reactivo metilante disminuye hasta niveles que no ocasionan interferencia en el detector (Figura 9).

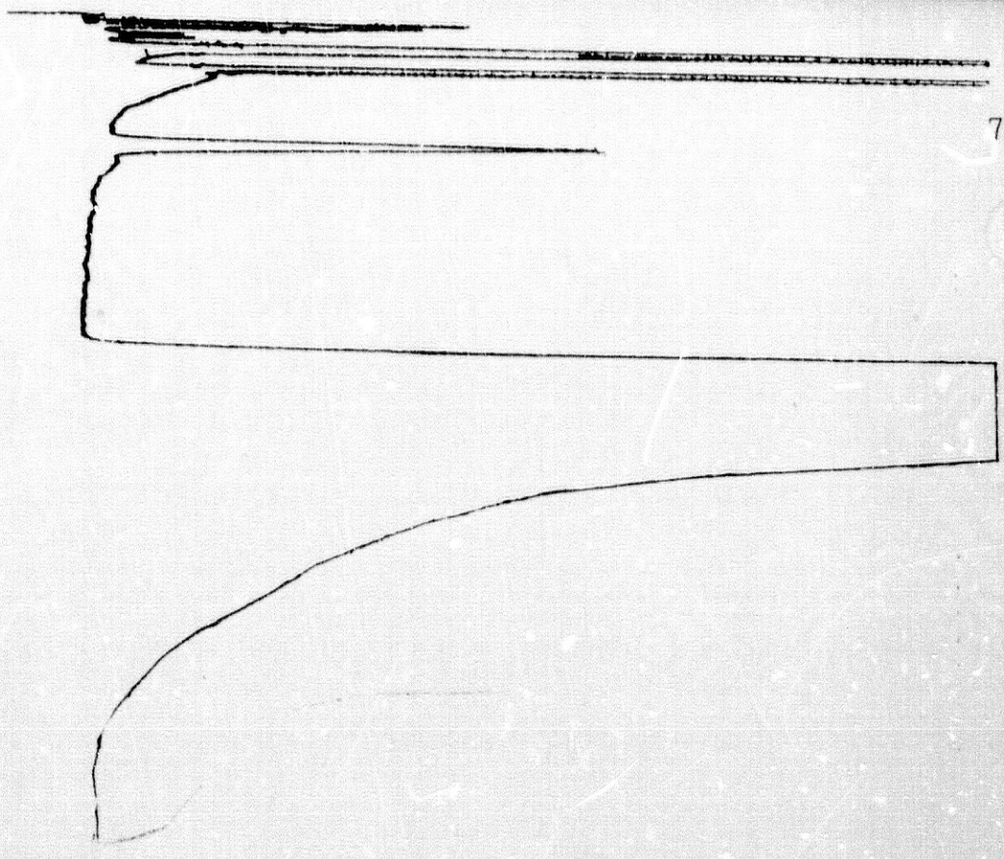


FIGURA 8 .- Cromatograma obtenido tras la reacción de metilación del SCN^- sin eliminación del exceso de agente metilante ($SO_4(CH_3)_2$).

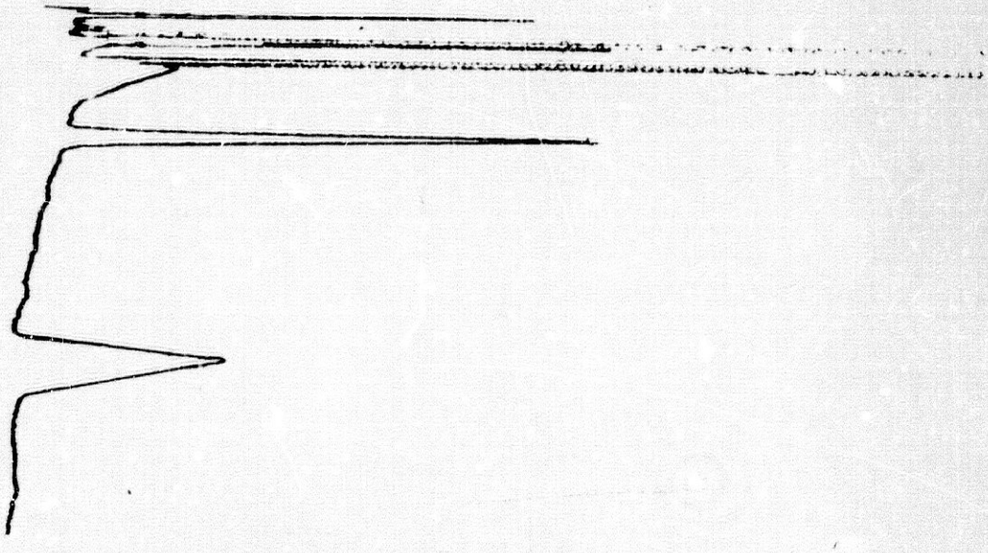


FIGURA 9 .- Cromatograma obtenido tras la reacción de metilación del SCN^- con eliminación del exceso de agente metilante ($SO_4(CH_3)_2$), por calor.

II.3.6. Efecto de la temperatura en la reacción de metilación.

Se comprobado que esta elevación de la temperatura no supone alteración (pérdida o descomposición) del tiocianato de metilo ni del tiocianato de etilo.

Para ello se procedio a un estudio de la reacción en las condiciones siguientes:
Se parte de 1 ml de una disolución 10^{-3} g/l de $SCNCH_3$ a la que se agregan 50 µl de estandar interno. Se calienta a una temperatura de 65ºC durante 30 minutos a reflujo en baño de agua. Transcurrido ese tiempo se inyecta 1 µl en el cromatografo de gases comprobandose que la concentración concuerda con un ensayo realizado paralelamente sin haberse sometido al efecto de la temperatura.

Los cromatogramas obtenidos en ambos casos son los correspondientes a la Figura 10.

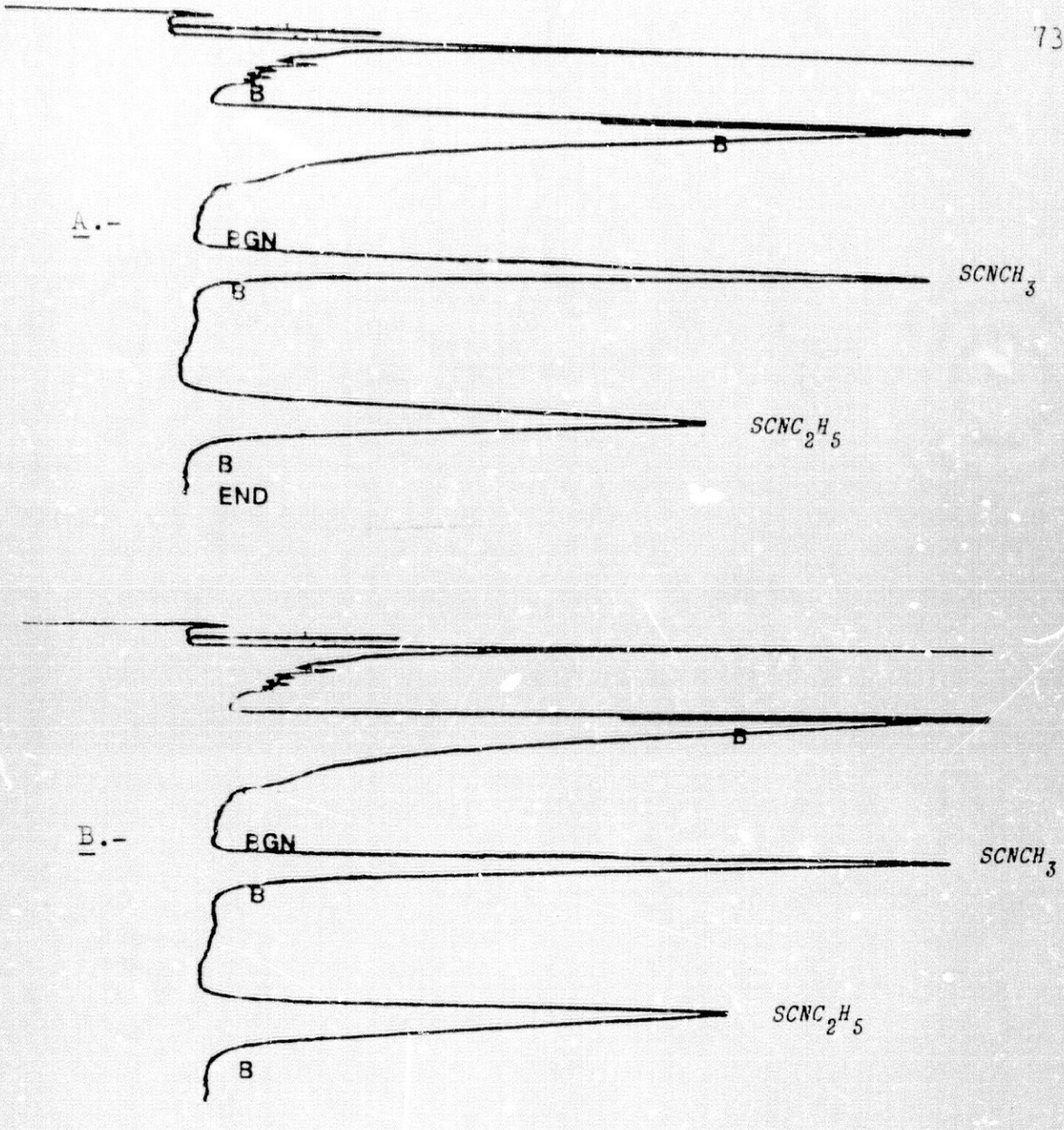


FIGURA 10- Cromatogramas de una disolución patrón de $SCNCH_3$ y $SCNC_2H_5$ de concentración 10^{-3} g/l:

A)- Sin calentar.

B)- Calentando a 65ºC durante 30 minutos.

II.3.7. Rendimiento de la reacción de metilación.

Para calcular el rendimiento de la reacción de metilación descrita en el capitulo II.3.1. se han preparado disoluciones acuosas de SCNK de concentraciones 5 10^{-4}g/l y 10^{-3}g/l referidas a ión tiocianato.

Una vez realizada la metilación se extrae 1 ml de la disolución acuosa de $SCNCH_3$ con 1 ml de benceno. Se le añaden 50 µl de estandar interno ($SCNC_2H_5$) y se inyecta 1 µl en el cromatografo de gases en las condiciones expuestas en el capitulo II.3.2.

Con las Tablas VI y VII se muestran los resultados obtenidos para cada una de las disoluciones ensayadas.Los cromatogramas de las Figuras 11, 12 corresponden a los ensayos descritos anteriormente.

TABLA VI

Disolución 10^{-3} g/l.

A_i	A_o	C_i	C_o
2.6638	2.9881	$8.4021 \cdot 10^{-4}$	$25 \cdot 10^{-4}$
3.0036	3.0051	9.4205 "	25 "
2.7870	3.1998	8.2091 "	25 "
3.4619	3.3336	9.7878 "	25 "
3.0037	3.0052	9.4206 "	25 "
3.3011	3.7008	8.4070 "	25 "
3.4672	4.0371	8.5147 "	25 "
3.1552	3.5489	8.3794 "	25 "
3.6036	3.6784	9.2333 "	25 "
3.6328	3.9252	8.7227 "	25 "
3.5072	3.7044	8.9231 "	25 "

$\overline{C_i} = 8.8564 \cdot 10^{-4}$

$\overline{A_i} = 3.2352$

Rendimiento = 88.56%

$\sigma = 0.5081$

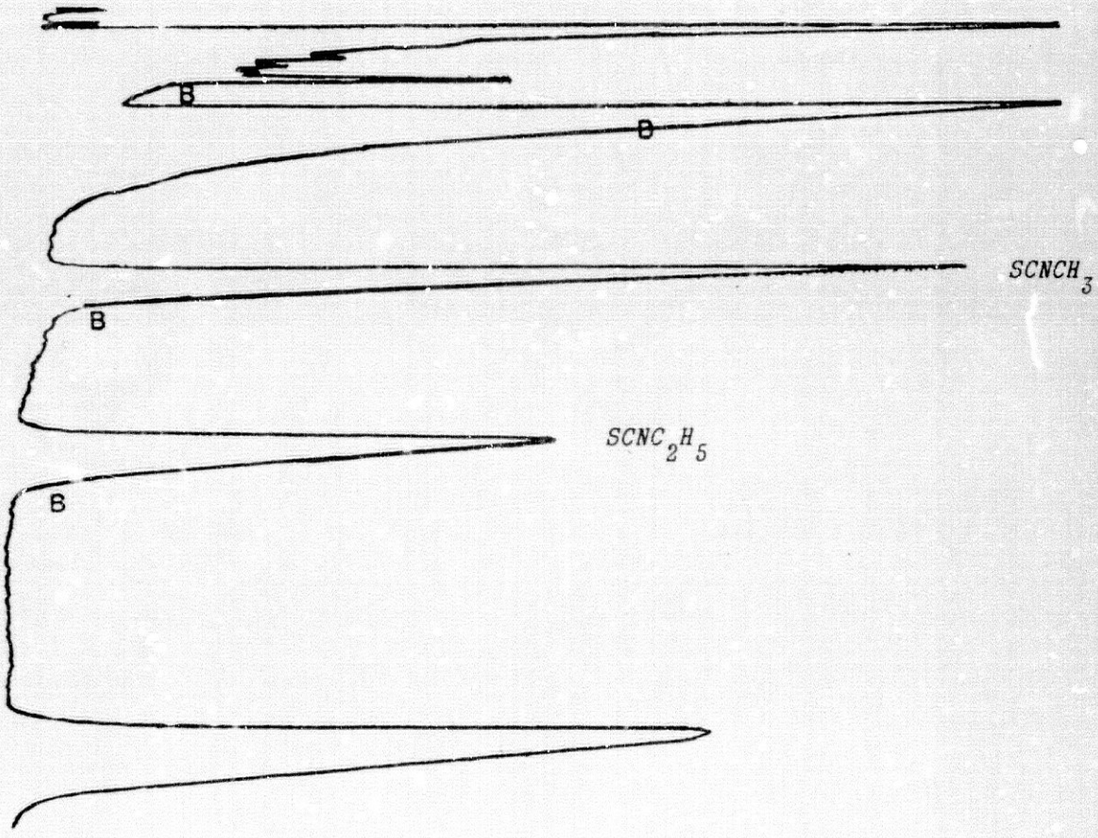


FIGURA 11.- Cromatograma para el cálculo del rendimiento en la reacción de metilación para concentración de SCN^- de 10^{-3} g/l.

TABLA VII

Disolución 5.10^{-4} g/l.

A_i	A_o	C_i	C_o
1.9464	4.0630	$4.5150 \cdot 10^{-4}$	$25 \cdot 10^{-4}$
2.3122	4.4995	4.8433 "	25 "
1.8796	4.3910	4.0346 "	25 "
1.9130	4.3220	4.1717 "	25 "
1.9660	4.0169	4.4721 "	25 "
2.0312	4.2859	4.4600 "	25 "
1.9204	4.0169	4.5060 "	25 "
2.1033	4.3010	4.6091 "	25 "
1.8939	4.4010	4.0560 "	25 "
2.0785	4.3597	4.4936 "	25 "
1.8664	4.0159	4.3805 "	25 "

$\overline{C}_i = 4.4129 \cdot 10^{-4}$

$\overline{A}_i = 1.9919$

Rendimiento = 88.25 %

$\sigma = 0.24$

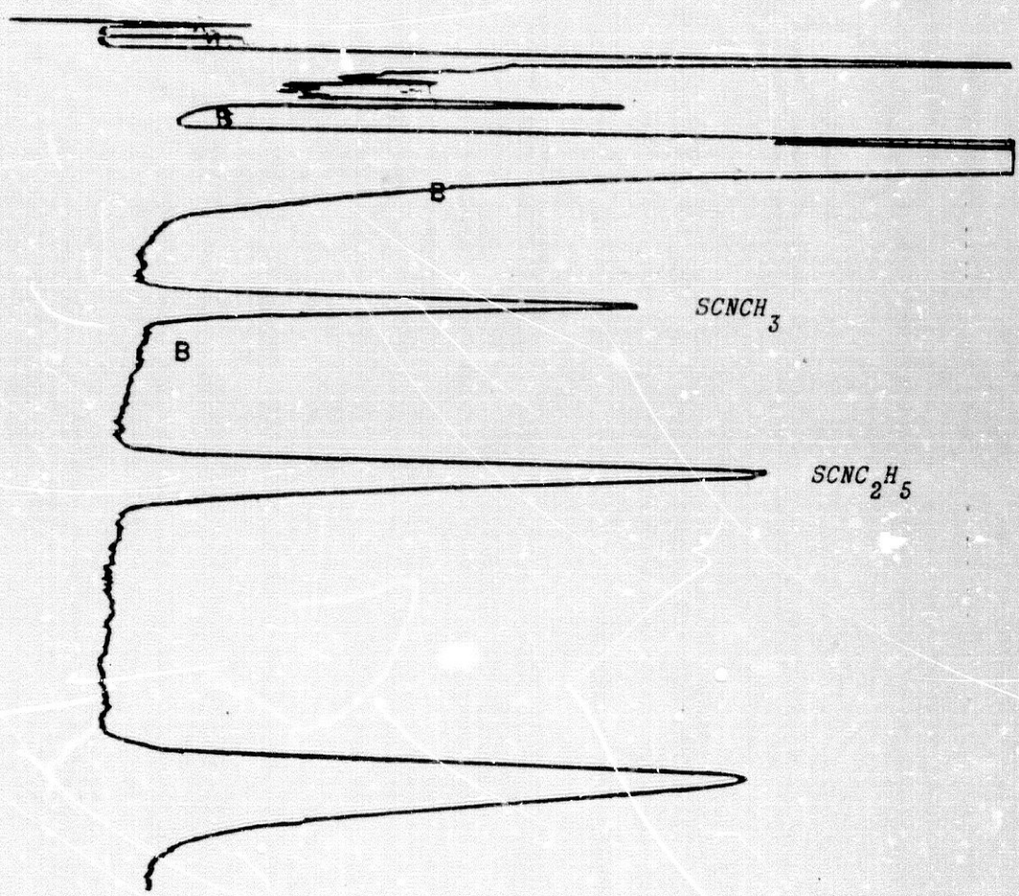


FIGURA 12.- Cromatograma para el cálculo del rendimiento en la reacción de metilación para concentración de SCN^- de $5 \cdot 10^{-4}$ g/l.

II.4. DETERMINACION DE SCN^- EN VEGETALES COMESTIBLES

II.4.1. Selección de las muestras.

Para la realización del presente trabajo se escogieron una serie de hortalizas y verduras, que como se deduce de encuestas previas realizadas en zonas de bocio endemico de la provincia de Granada algunas de ellas, forman parte casi a diario de la dieta de esta región (Augustin Campos y col. 1984).

Se han analizado los siguientes vegetales:

Fam. Compuestas

-Lactuca sativa (lechuga)

-Chicorium endivia, var. latifolia (acelga)

Fam. Cruciferas

-Brassica oleracea (col)

-Brassica oleracea var. botrytis (coliflor)

-Brassica oleracea, var. gemminifera (col de Bruselas)

Fam. Cucurbitaceas

-Cucumis sativus (pepino)

Fam. Liliaceas

-Allium cepa (cebolla)

-Allium sativum (ajo)

-Apium graveolens (apio)

Fam. Quenopodiaceas

-Spinacea oleracea (espinaca)

Fam. Solanaceas

-Lycopersicum esculentum (tomate)

Fam. Umbeliferas

-Daucus carota (zanahoria)

II.4.2. Preparación de las muestras.

Todas las muestras analizadas proceden del mercado y los analisis se han realizado una vez desecado el vegetal, para ello, una vez limpio y troceado, se pesa y se mantiene en estufa a 100ºC hasta peso constante.

La muestra desecada se pulveriza y conserva en recipiente cerrado hermeticamente hasta su utilización. De este proceso se ha podido deducir el contenido en humedad de todos los vegetales analizados, lo que se recoge en la Tabla VIII.

TABLA VIII

Muestra	% Humedad
Allium cepa (cebolla)	92,8
Allium sativum (ajo)	63,7
Apium graveolens (apio)	94,2
Brassica oleracea (col)	91,5
Brassica oleracea, var. botrytis (coliflor)	91,8
Brassica oleracea. var. gemminifera (col de Bruselas)	84,1
Cucumis sativus (pepino)	95,4
Chicorium endivia, var. latifolia (acelga)	91,0
Daucus carota (Zanahoria)	88,9

Lactuca sativa (lechuga)	94,7
Lycopersicum esculentum (tomate)	93,4
Spinacea oleracea (espinaca)	92,9

II.4.3. Extracción del ión SCN^-.

En el presente trabajo se han seguido dos métodos a fin de liberar el ión SCN^- de las moleculas de tioglucosido. En trabajos anteriormente realizados por numerosos autores hemos comprobado la posibilidad de liberar el ión SCN^- sin necesidad de que actue una enzima hidrolitica propia del tejido vegetal y añadida expresamente para este fin. En esta línea de investigación cabe citar un trabajo realizado por Hirosue y col. (1983) y que nos ha servido de base para realizar algunos capitulos de esta Memoria de Licenciatura.

De otra parte, es mucho más frecuente la utilización de la enzima tioglucosido glucohidrolasa aislada, tal como citamos en el capitulo II.2.2. , con el fin de liberar el ión SCN^- de los glucosidos para su posterior valoración por cualquiera de los métodos analíticos ya discutidos en la introducción.

Según lo comentado hemos realizado un trabajo paralelo con todos los vegetales en estudio, de modo que, antes de la determinación por cromatografia en fase gaseosa y detector de captura electrones , hemos liberado el SCN^- tanto mediante una hidrolisis quimica, como mediante hidroli

sis enzimatica. La técnica seguida en cada uno de los casos se describe detenidamente en los siguientes capitulos.

II.4.4. Extracción de SCN^- mediante hidrolisis quimica.

Se ha seguido la técnica hidrolitica propuesta por Hirosue y col. (1983), en cuyo caso, se parte de 2 g de muestra seca que se dispone en tubos de centrifuga donde se añaden 10 ml de agua destilada, se agita durante 5 minutos y se deja estar a temperatura ambiente 30 minutos.

Pasado ese tiempo se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos, se recoge el sobrenadante que se filtra y se reserva. El residuo se vuelve a suspender con 5 ml de agua destilada y se centrifuga en las condiciones ya citadas. De nuevo se recoge el sobrenadante que una vez filtrado se une al extracto anterior. Se completa hasta un volumen constante de 10 ml en matraz aforado, con agua destilada.

Hay que hacer algunos comentarios según la muestra analizada, ya que, debido al bajo contenido en SCN^- de algunas muestras se ha preferido, en todos los casos, llevar el extracto acuoso a un volumen final de 10 ml, en vez de a los 20 ml que aconseja Hirosue y col.(1983).

De otra parte, los analisis del Allium cepa (cebolla) plantean algunos problemas en la manipulación debido al alto contenído en mucilagos de este vegetal, lo que enlente-

ce el proceso de filtración.

El análisis de la Spinacea oleracea (espinaca), al tener un elevado contenido en oxalato, dificulta también la filtración.

Se ha realizado un estudio previo al establecimiento de la técnica hidrolitica definitiva para determinar el tiempo de hidrolisis más adecuado a fin de obtener el máximo rendimiento en la obtención de SCN^- libre. Se toman en todos los casos 2 g de muestra (Brassica oleracea y Chicorium endivia, var. latifolia) y se someterá a distintos tiempos de hidrolisis comprendidos entre 5 y 60 minutos. Las ppm de tiocianato obtenidas tras el analisis por cromatografia en fase gaseosa, según el proceso de metilación descrito en el capitulo II.3.1. , permite deducir que el tiempo óptimo de hidrolisis es de 30 minutos, tal como se observa de los resultados indicados en la Tabla IX.

TABLA IX

Tiempo hidrolisis (min.)	ppm SCN^-	
	Col	Acelga
5	8,4538	0,1823
15	9,6508	0,2134
30	9,7012	0,2628
60	9,7142	0,2619

II.4.5. Determinación de ión SCN^- por cromatografia gas-liquido (CGL).

Como ya se ha indicado en el capitulo II.3.1. correspondiente a ensayos previos, el SCN^- se puede determinar mediante la obtención de $SCNCH_3$ que da una respuesta adecuada en el detector de captura electrones. A tal fin una vez aislado el ión SCN^- de los tioglucosidos se procede a la metilación de este ión.

La tecnica seguida parte de 1 ml de la disolución obtenida tras el proceso hidrolitico. A este volumen dispuesto en tubo de ensayo se le agregan 50 μl de $SO_4(CH_3)_2$ y se lleva a reflujo en baño de agua a temperatura regulada a 65ºC, durante 30 minutos. A continuación se agrega 1 ml de benceno, se agita y a la fase organica, que contendrá el $SCNCH_3$, se agregan 50 μl de $SCNC_2H_5$ (estandar interno). De esta disolución se inyecta 1 μl en el cromatografo de gases bajo las condiciones ya reseñadas en el capitulo II.3.2.

El contenido medio de SCN^- calculado a partir de tres ensayos concordantes tras el análisis de las hortalizas y verduras citadas anteriormente se recogen en la Tabla X.

Los cromatogramas correspondientes a los ensayos descritos corresponden a las Figuras 13 a 24.

TABLA X

Muestra	SCN^- en muestra seca (ppm)
Allium cepa (cebolla)	0,4395
Allium sativum (ajo)	5,5801
Apium graveolens (apio)	0,2871
Brassica oleracea (col)	9,8576
Brassica oleracea, var. botrytis (coliflor)	41,1221
Brassica oleracea, var. gemminifera (col de Bruselas)	39,9501
Cucumis sativus (pepino)	1,7197
Chicorium endivia, var. latifolia (acelga)	0,2734
Daucus carota (zanahoria)	0,3825
Lactuca sativa (lechuga)	0,1811
Licopersicum esculentum (tomate)	0,6655
Spinacea oleracea (espinaca)	0,4419

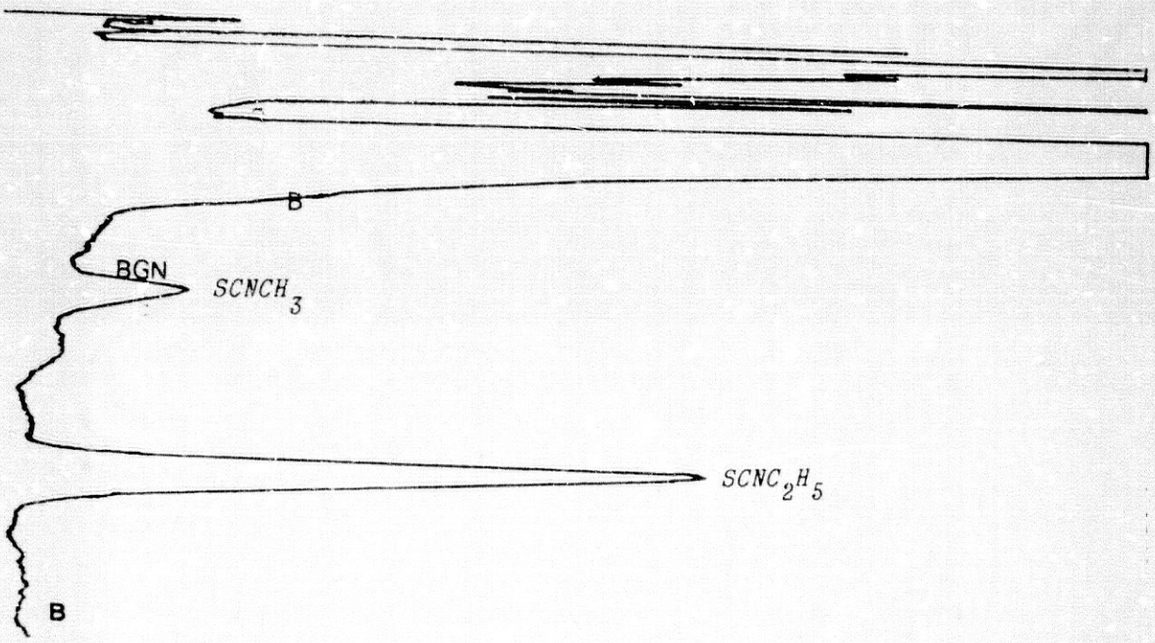


FIGURA 13.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Allium cepa (cebolla).

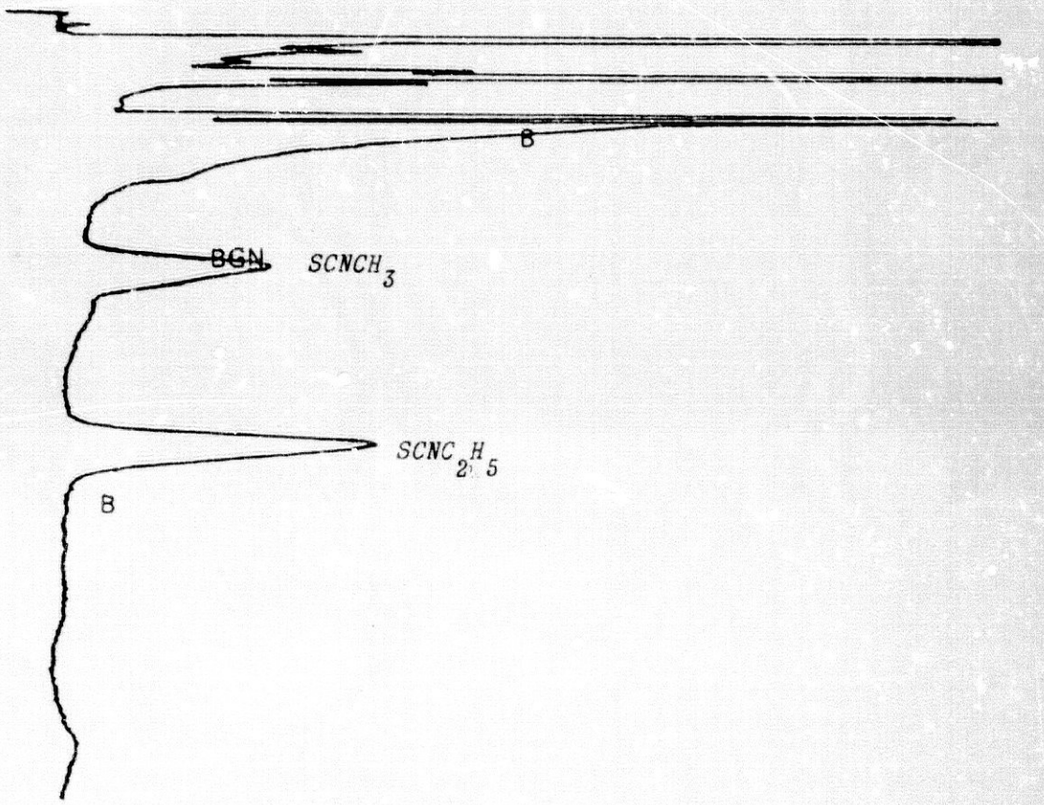


FIGURA 14.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis química de Allium sativum (ajo).

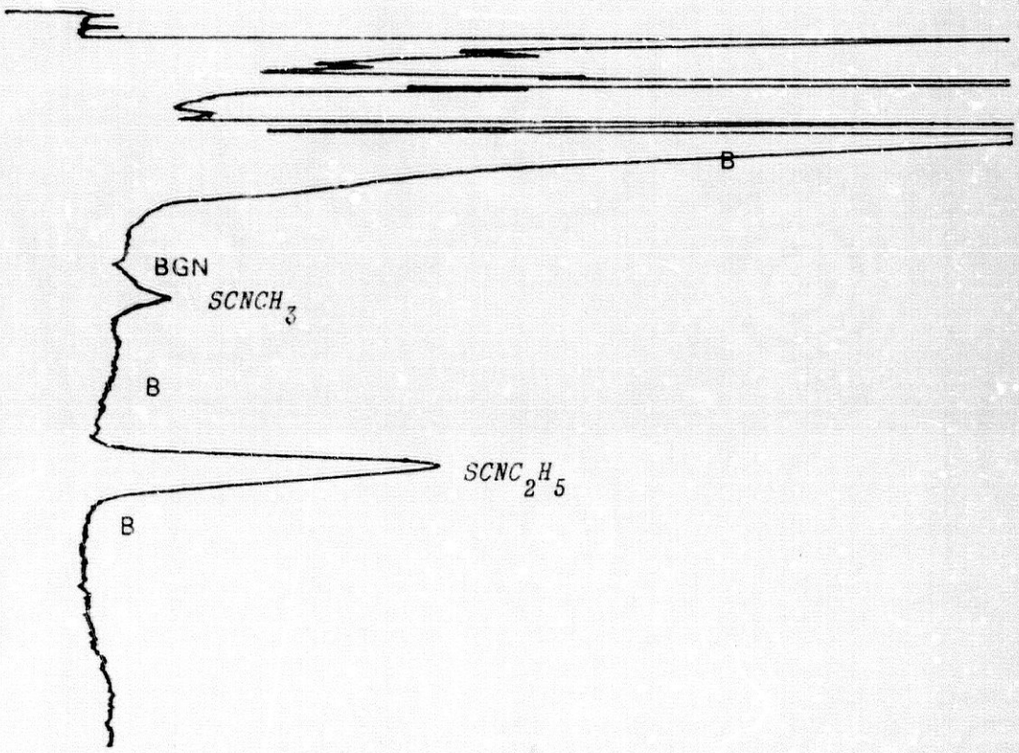


FIGURA 15.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Apium graveolens (apio).

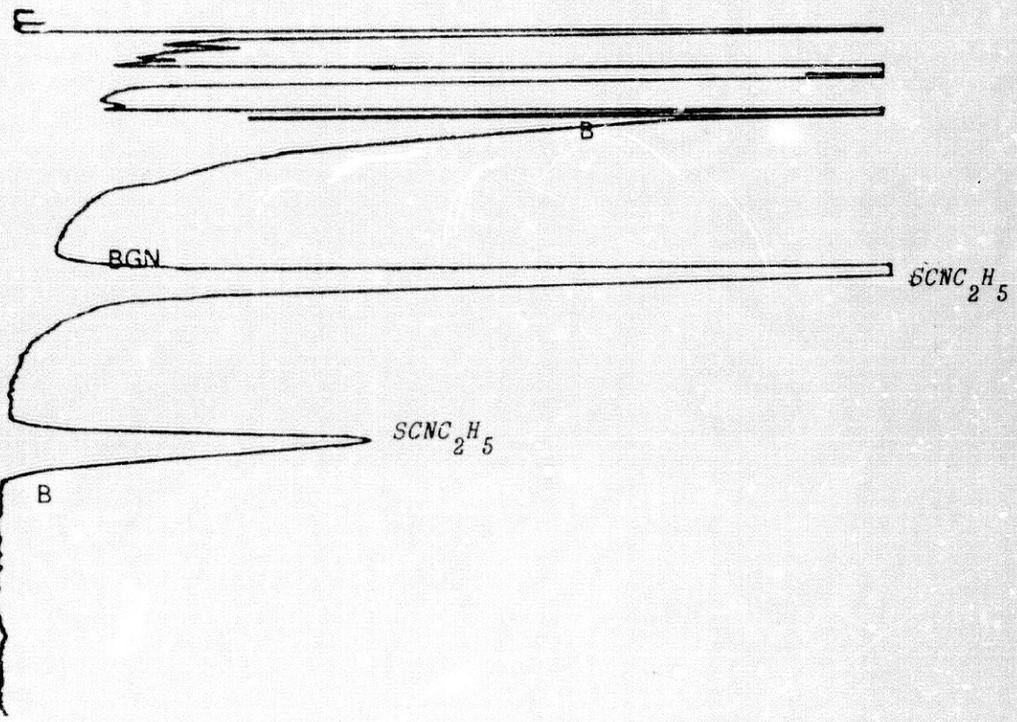


FIGURA 16.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Brassica oleracea (col).

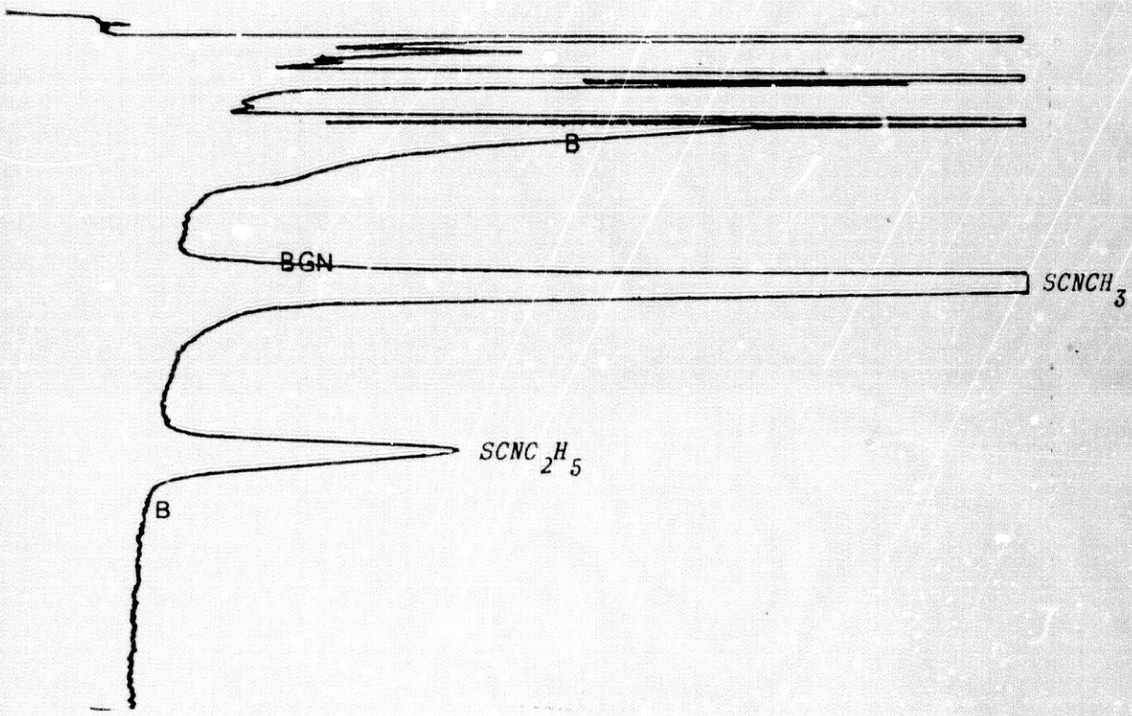


FIGURA 17.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Brassica oleracea, var. botrytis (coliflor).

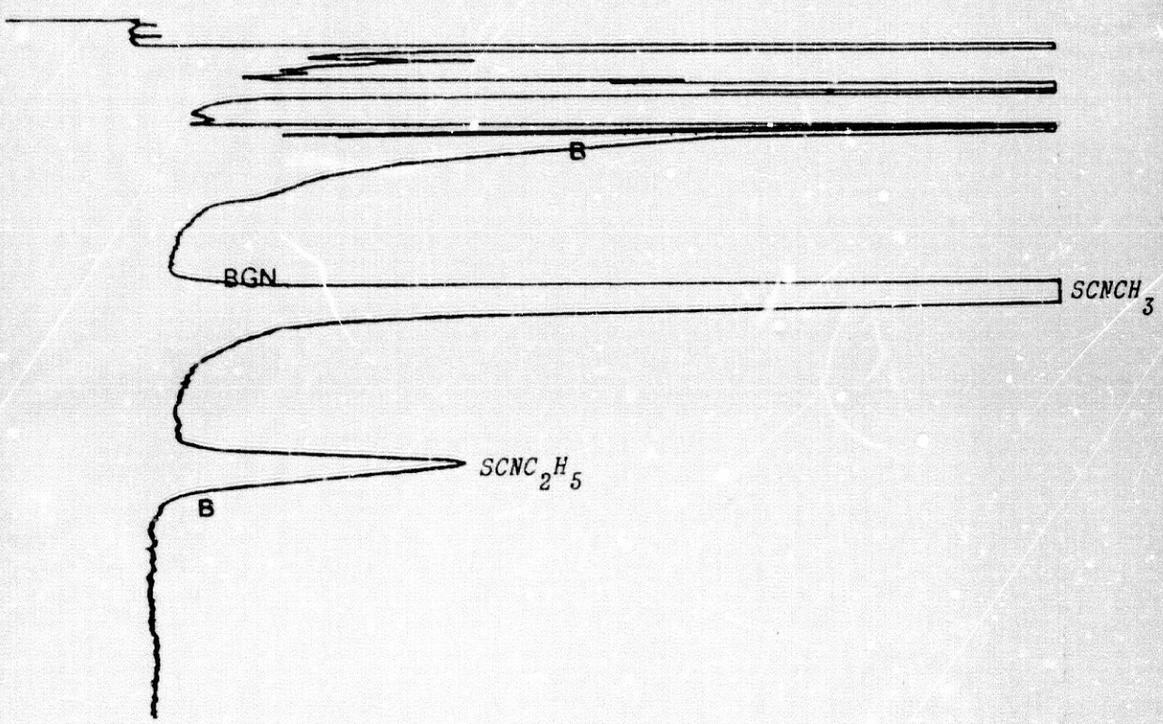


FIGURA 18.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Brassica oleracea, var. gemminifera (col de Bruselas)

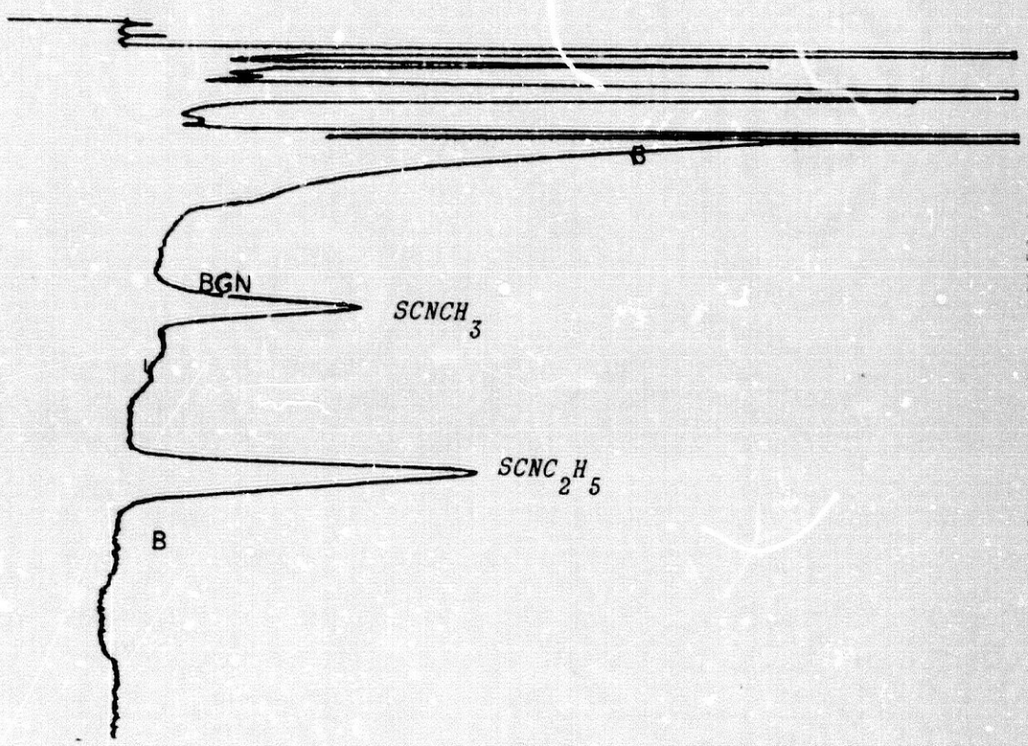


FIGURA 19.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Cucumis sativus (pepino).

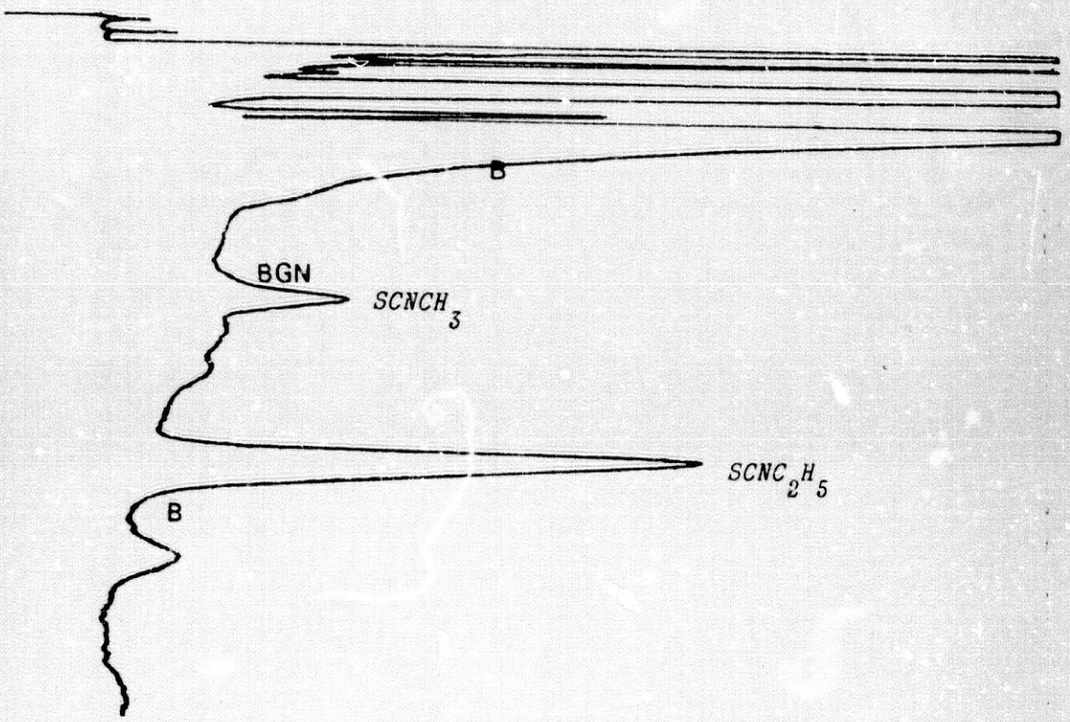


FIGURA 20.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis química de Chicorium endivia, var. latifolia (acelga).

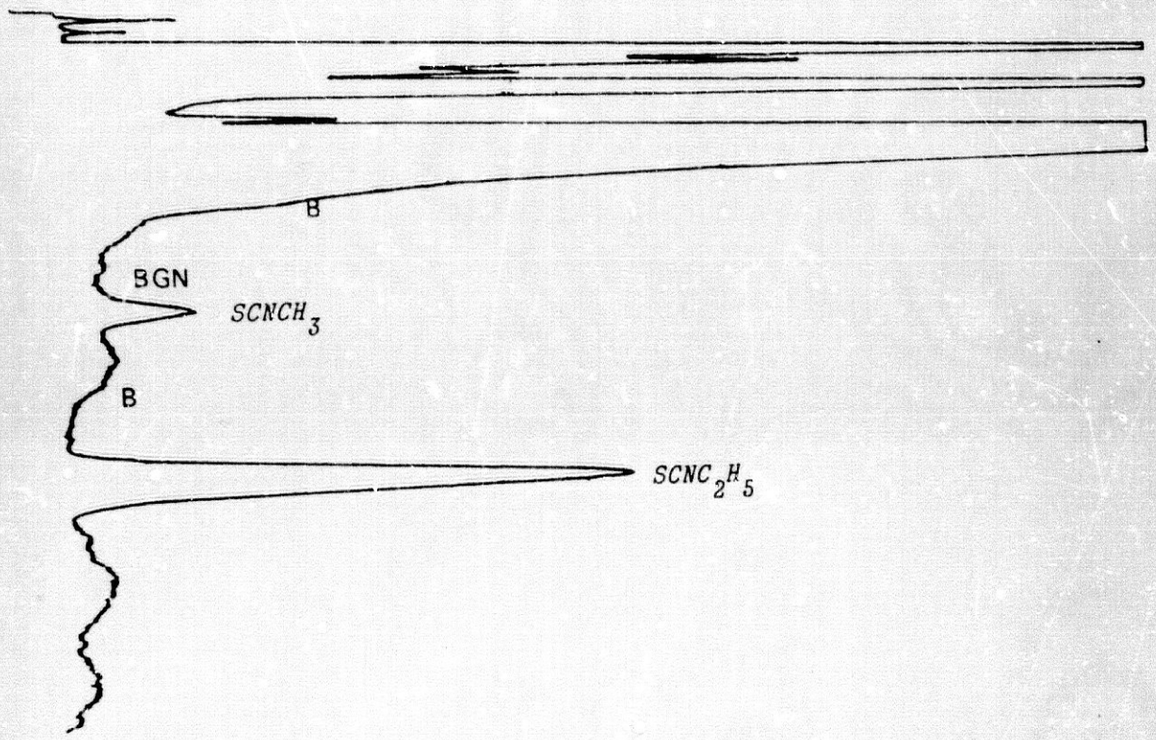


FIGURA 21.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Daucus carota (zanahoria)

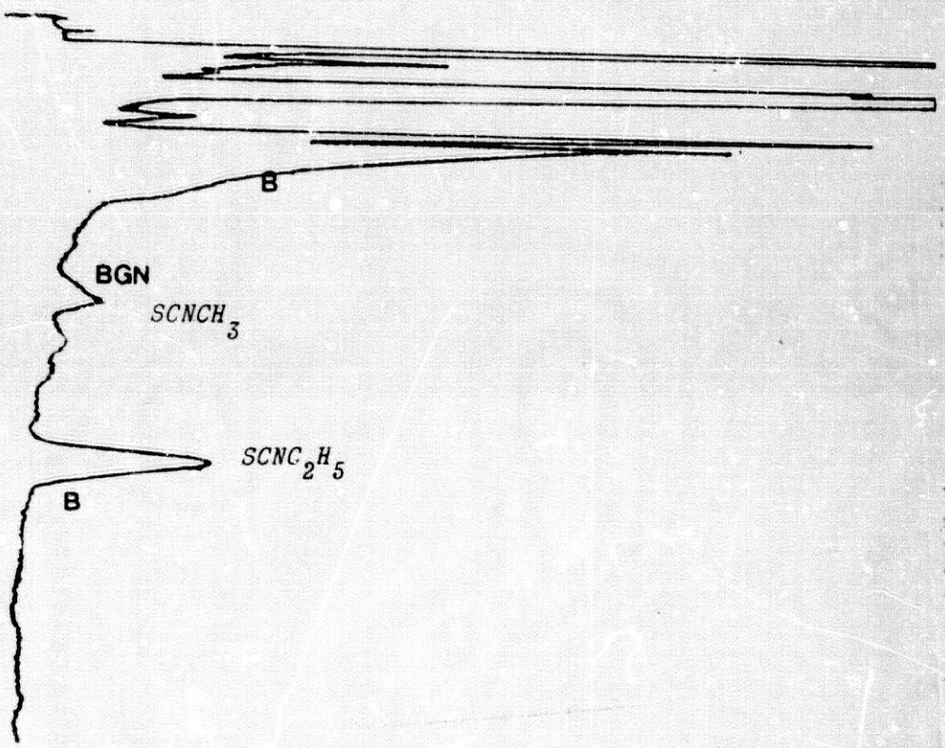


FIGURA 22.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Lactuca sativa (lechuga).

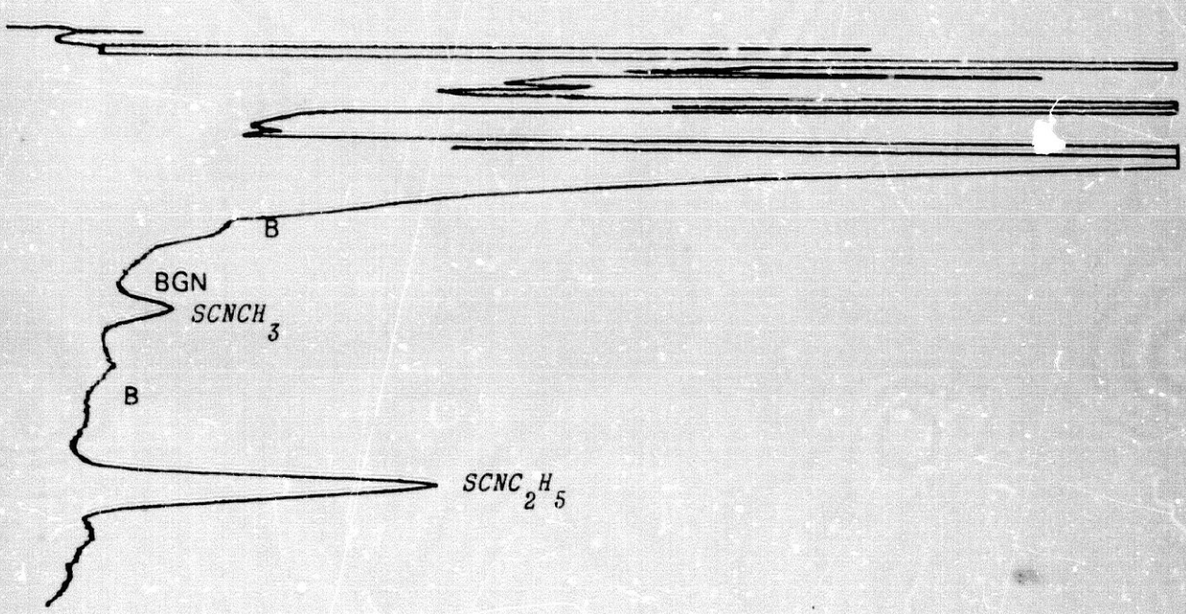


FIGURA 23.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Licopersicum esculentum (tomate).

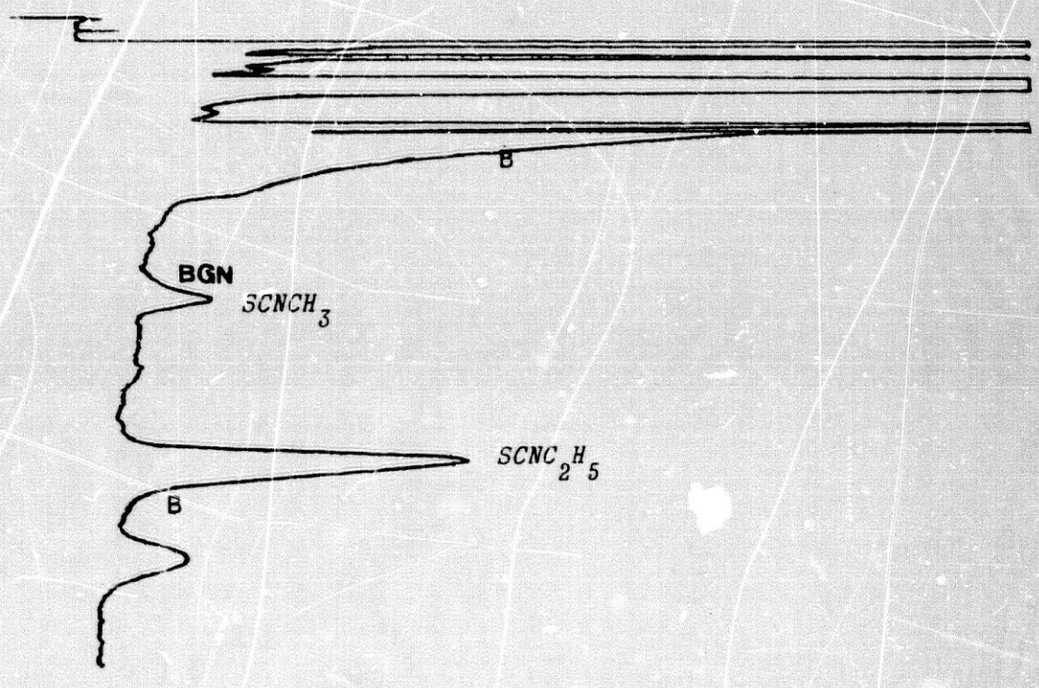


FIGURA 24.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis quimica de Spinacea oleracea (espinaca).

II.4.6. Extracción del ión SCN mediante hidrolisis enzimatica.

Este proceso hidrolitico que es el recomendado por la mayoria de los investigadores, se basa en la acción selectiva de la tioglucosido glucohidrolasa (EC.3.2.2.1.) sobre los tioglucosidos de los vegetales objeto de analisis.

Se parte, en los ensayos realizados, de 1 g de muestra seca a la que se añaden 10 ml de disolución de acetato sodico 0.1 M y 0.5 ml de disolución de mirosinasa al 1 %. Se agita y se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se adicionan 1.2 ml de disolución de NaOH 1 N y se agita 5 minutos. Una vez filtrado se enrasa en matraz aforado hasta 10ml con agua destilada. De esta disolución, en la que debe existir tiocianato libre, se toma 1 ml que se somete a metilación para realizar, con posterioridad, el análisis cromatográfico.

El proceso de metilación seguido con estas muestras es en todos los casos igual al descrito en el capitulo anterior (II.4.5.), pero debido al mayor rendimiento que se obtiene al analizar muestras muy ricas en SCN^-, como son las coles de Bruselas (Brassica oleracea var. gemmifera), col (Brassica oleracea), y coliflor (Brassica oleracea var.

botrytis), ha sido conveniente inyectar en el cromatografo 0.5 µl de la disolución organica, en lugar de 1 µl como se ha recomendado con anterioridad.

La riqueza en SCN^- expresada en ppm y calculada a partir de tres ensayos concordantes se recoge en la Tabla XI.

Los cromatogramas correspondientes a los ensayos descritos anteriormente corresponden a las Figuras 25 a 36.

TABLA XI

Muestra	SCN^- en muestra seca (ppm.)
Allium cepa (cebolla)	0,7843
Allium sativum (ajo)	12,6849
Apium graveolens (apio)	0,4692
Brassica oleracea (col)	16,4011
Brassica oleracea, var. botrytis (coliflor)	89,1432
Brassica oleracea, var. gemmifera (col de Bruselas)	97,7351
Cucumis sativus (pepino)	4,5999
Chicorium endivia, var. latifolia (acelga)	1,1941
Daucus carota (zanahoria)	1,6312
Lactuca sativa (lechuga)	3,9206
Lycopersicum esculentum (tomate)	0,8219
Spinacea oleracea (espinaca)	2,5488

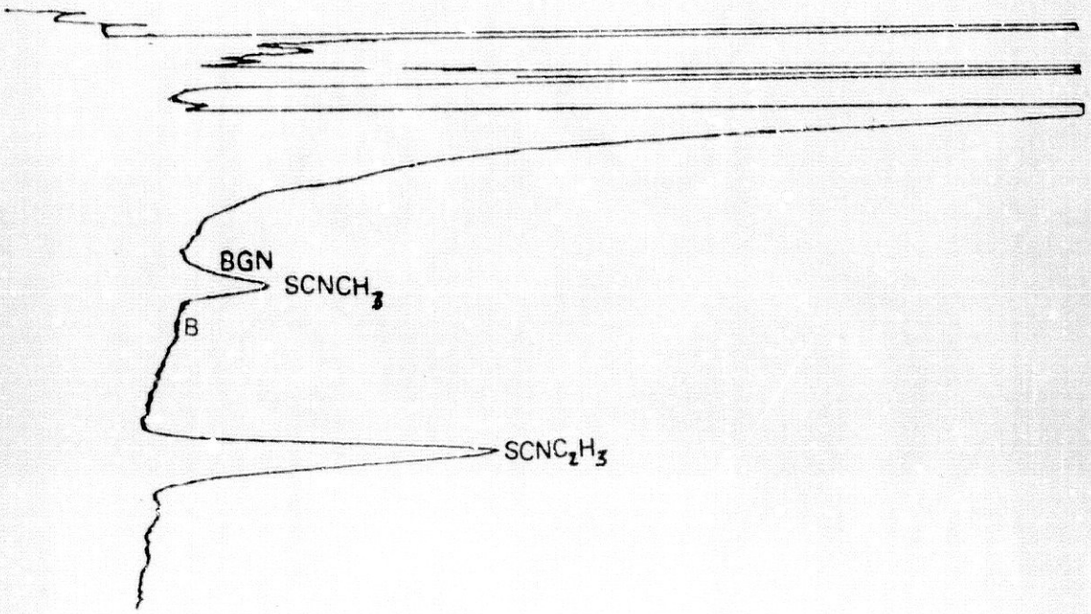


FIGURA 25.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Allium cepa (cebolla).

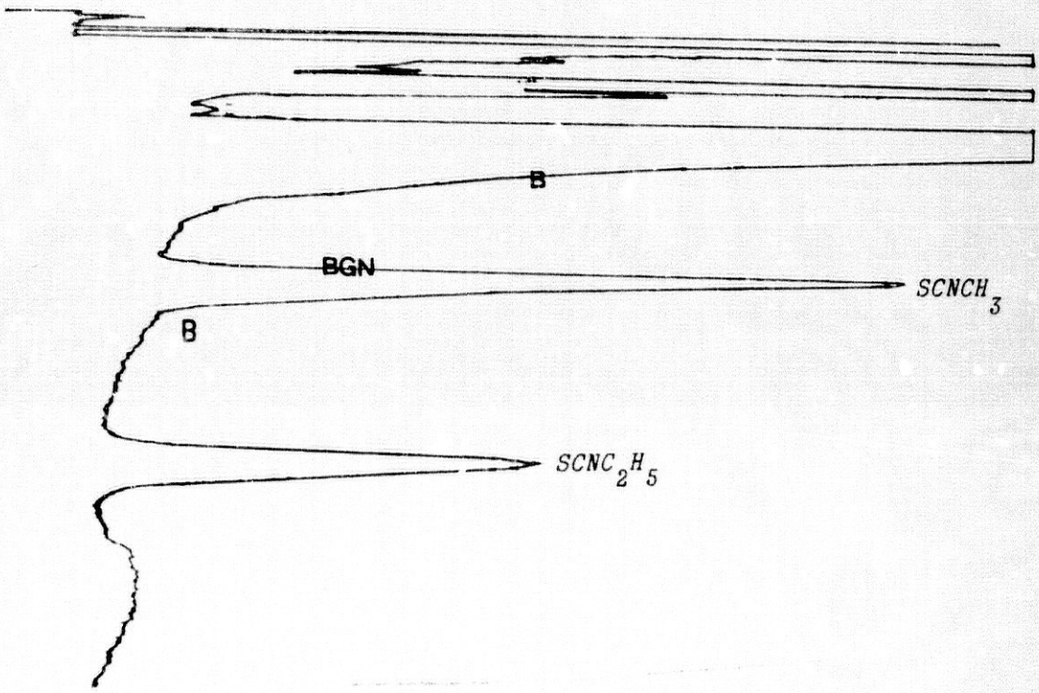


FIGURA 26.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Allium sativum (ajo).

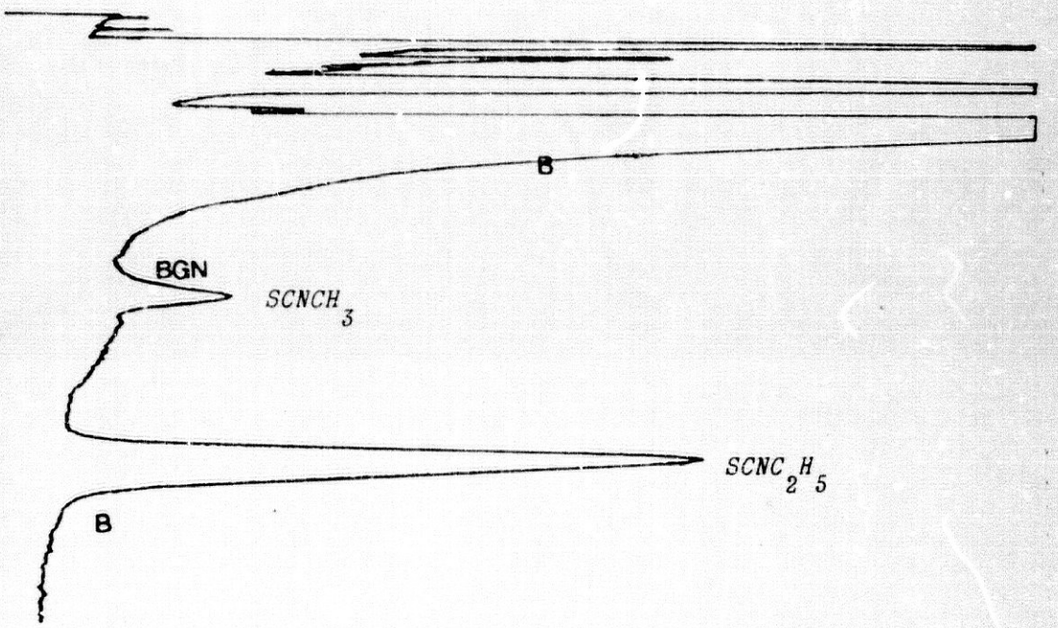


FIGURA 27.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Apium graveolens (apio)

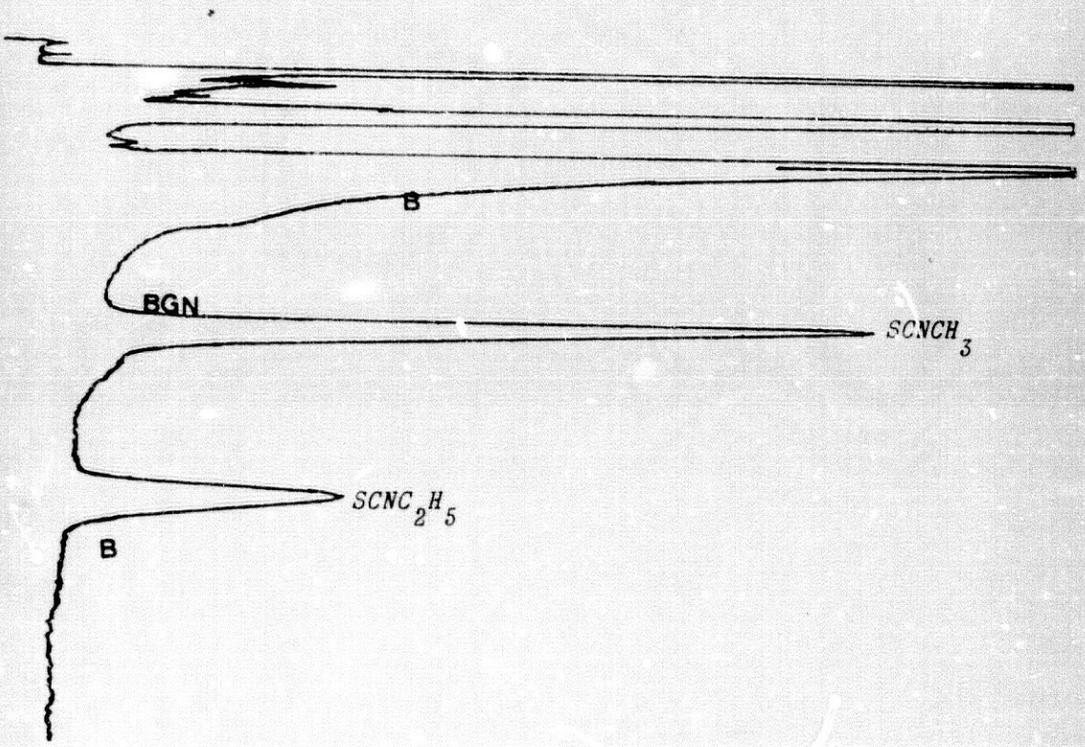


FIGURA 28.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Brassica oleracea (col)

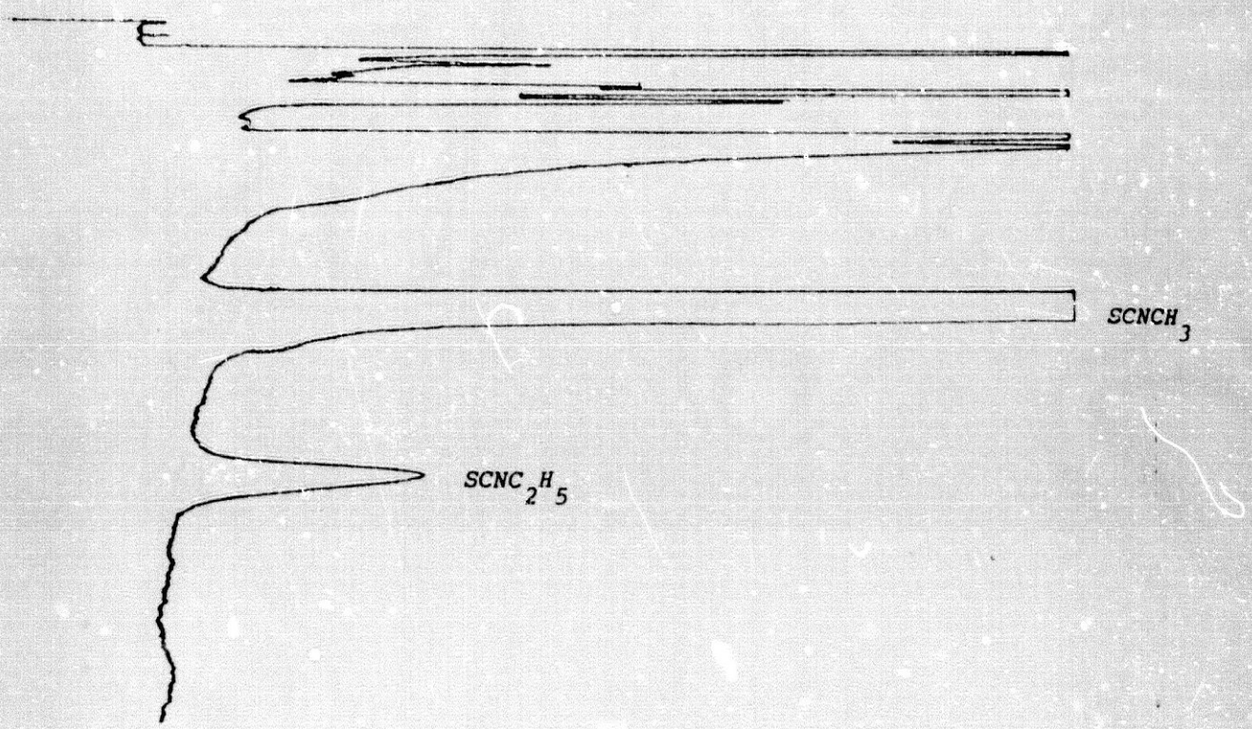


FIGURA 29.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Brassica oleracea, var. botrytis (coliflor)

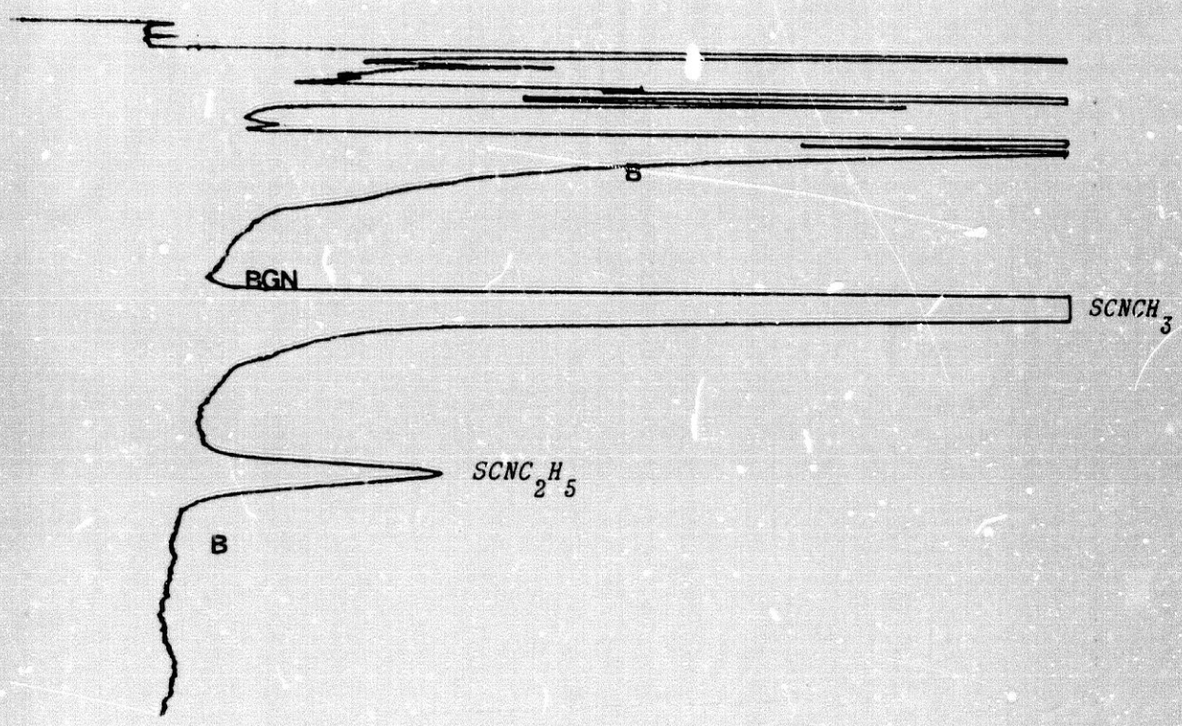


FIGURA 30.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Brassica oleracea, var. gemminifera (col de Bruselas)

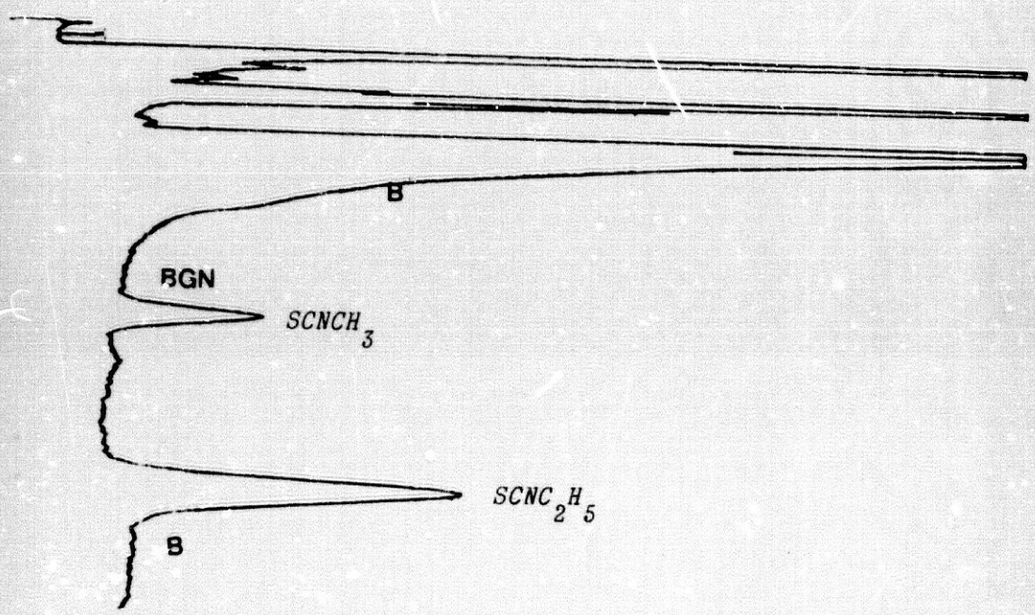


FIGURA 31.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Cucumis sativus (pepino).

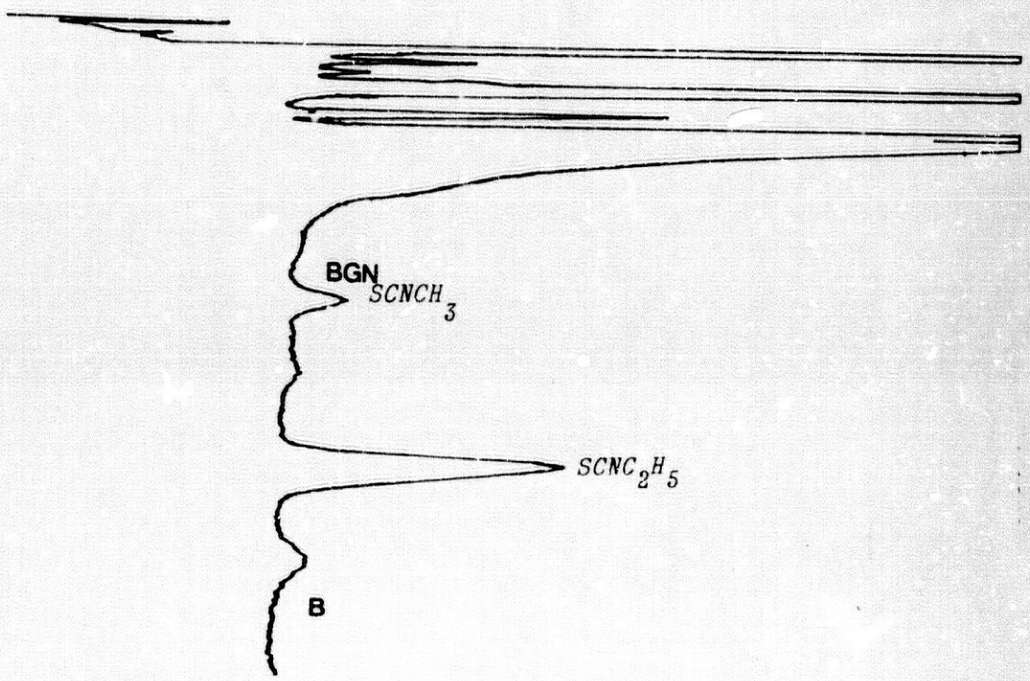


FIGURA 32.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Chicorium endivia, var. latifolia (acelga).

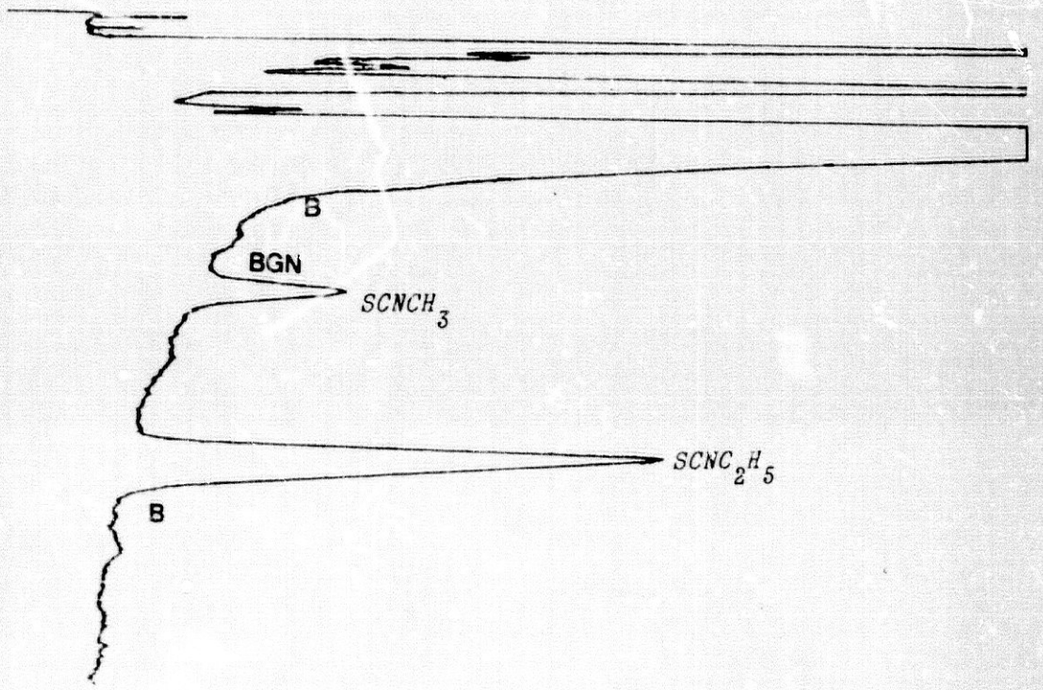


FIGURA 33.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Daucus carota (zanahoria)

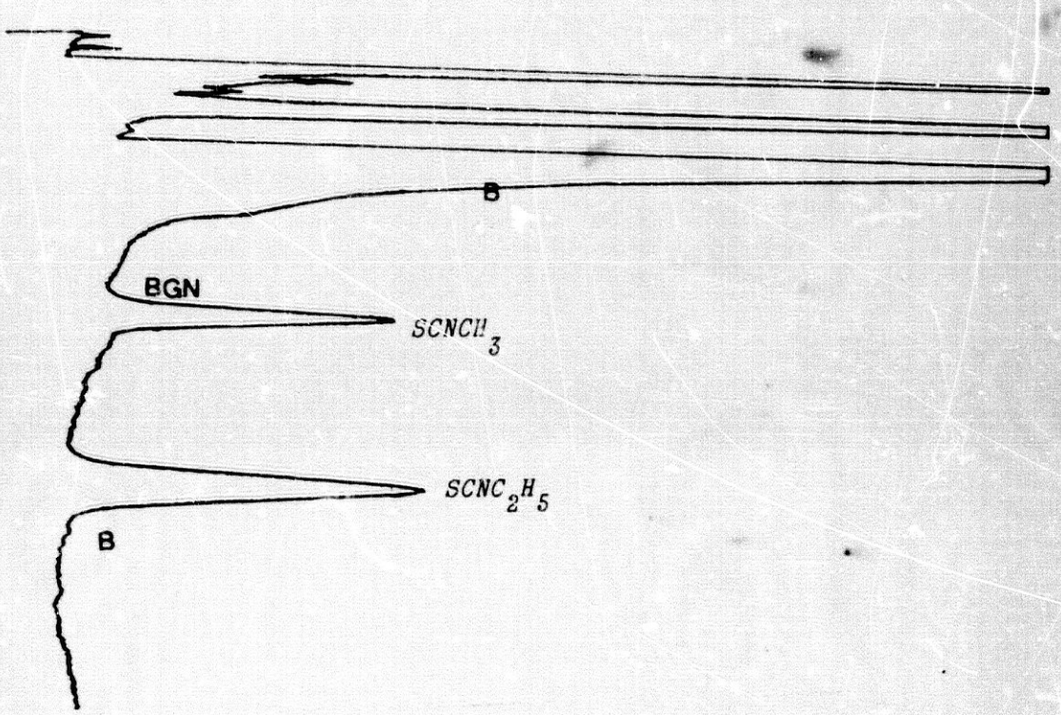


FIGURA 34.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Lactuca sativa (lechuga)

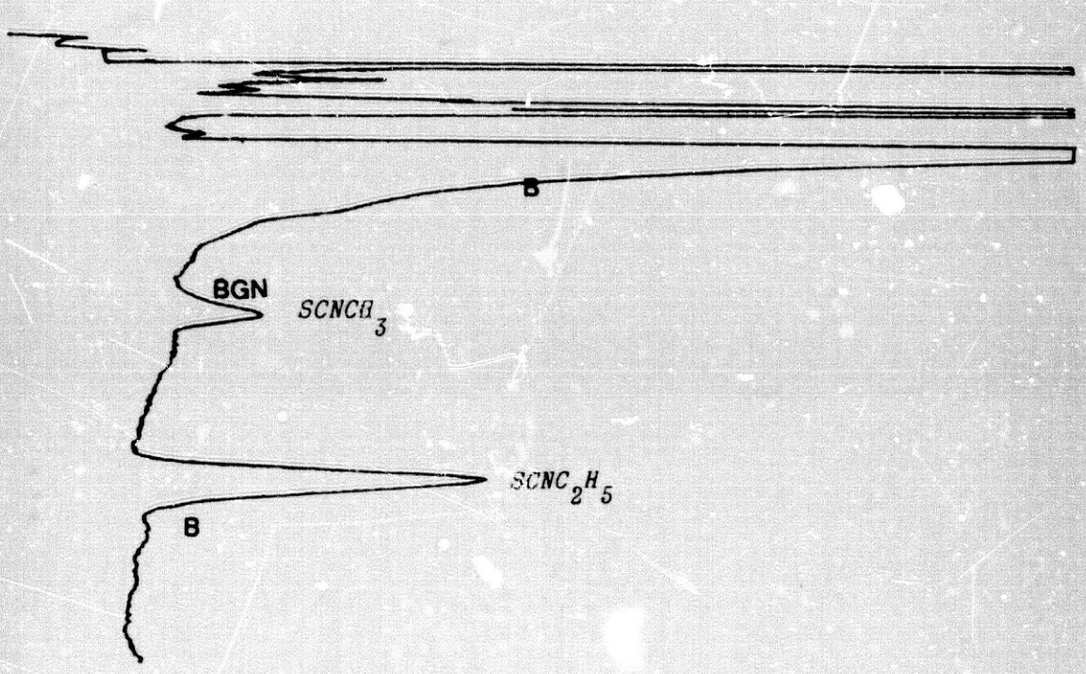


FIGURA 35.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Lycopersicum esculentum (tomate).

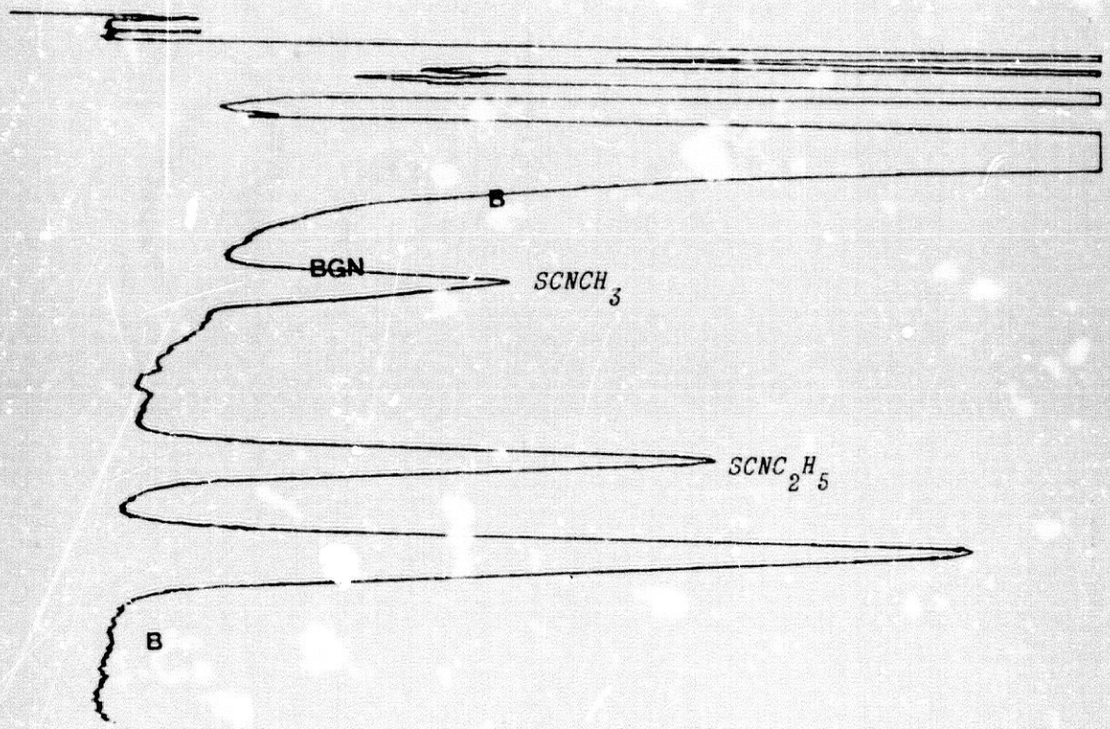


FIGURA 36.- Cromatograma correspondiente a la determinación del ión SCN^- por hidrolisis enzimatica de Spinacea oleracea (espinaca).

TABLA XII

Muestra	ppm SCN^- en muestra seca	
	Hidrolisis quimica	Hidrolisis enzimatic
Allium cepa (cebolla)	0,4395	0,7343
Allium sativum (ajo)	5,5801	12,6849
Apium graveolens (apio)	0,2871	0,4692
Brassica oleracea (col)	9,8576	16,4011
Brassica oleracea, var. botrytis (coliflor)	41,1221	89,1432
Brassica oleracea, var. gemmnifera (col de Bruselas)	39,9501	97,7351
Cucumis sativus (pepino)	1,7197	4,6999
Chicorium endivia, var. latifolia (acelga)	0,2734	1,1941
Daucus carota (zanahoria)	0,3825	1,6312
Lactuca sativa (lechuga)	0,1811	3,9206
Licopersicum esculentum (tomate)	0,6655	0,8219
Spinacea oleracea (espinaca)	0,4419	2,5468

II.4.7. Cálculos.

Para la expresión de la concentración de ión SCN^- presente en las muestras vegetales analizadas, se parte del valor P_i obtenido según la fórmula descrita en el capitulo II. 3.3.1.

P_i representa la concentración en mg de SCN^- que se encuentra en 1 ml de la muestra. Multiplicamos por 10 para expresarlo en el volumen total de filtrado. Para expresar la concentración en mg por kg de muestra siendo M los gramos de partida, la fórmula quedara:

$$P\ (mg/kg) = \frac{P_i \cdot 10 \cdot 1000}{M}$$

II.4.8. Ensayos de la mirosirasa (EC.3.2.2.1.) por cromatografia gas-liquido.

Para comprobar el posible incremento en la concentración de tiocianato en aquellos casos en los que se realiza una hidrolisis enzimatica, se ha realizado un estudio sobre la mirosinasa y se ha analizado por cromatografia gas-liquido, de igual modo, que se han realizado los ensayos con los tioglucosidos.

La técnica seguida consiste en tomar 0.10 ml de una disolución al 1% de mirosinasa que se disponen en un tubo de ensayo a los que se añaden 1 ml de agua destilada en vez del gramo de polvo correspondiente al vegetal objeto de análisis. Se adicionan 50 μl de $SO_4(CH_3)_2$, y se calienta a reflujo en baño de agua a 65ºC durante 30 minutos. Se deja enfriar y se añade 1 ml de benceno, de la fracción organica se toma 1 μl que se analiza por cromatografia gas-liquido en las condiciones de trabajo citadas en capitulos precedentes.

Los cromatogramas obtenidos tras cinco ensayos concordantes son similares al de la Figura 37 . En ningún caso se aprecia el pico correspondiente al $SCNCH_3$.

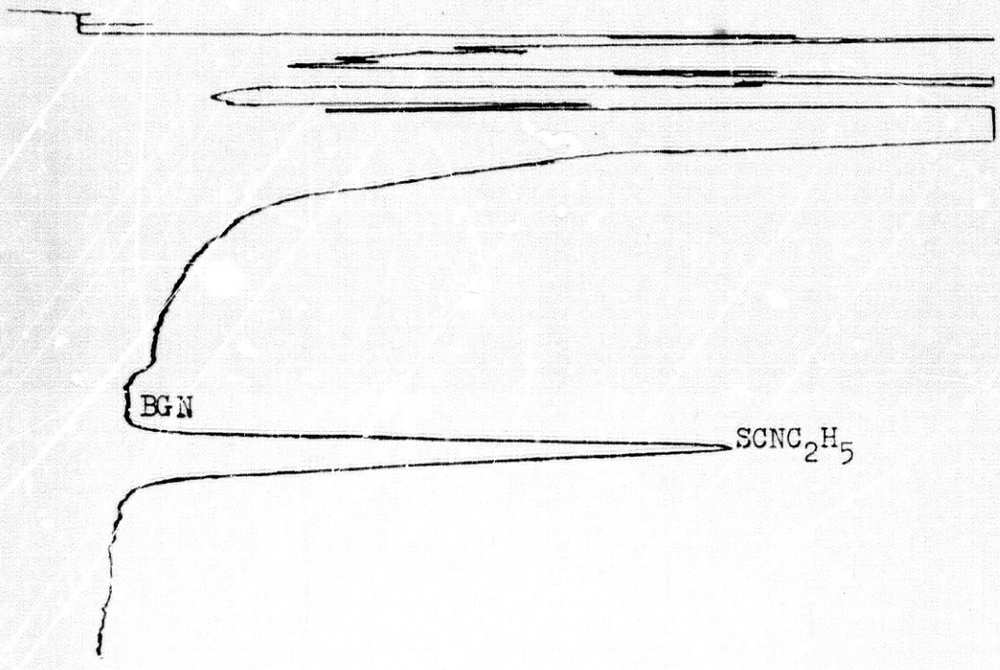


Figura 37.- Cromatograma correspondiente al ensayo de la enzima mirosinasa (EC 3.2.2.1.).

III. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

- Se han realizado ensayos a fin de comprobar que reacción química es más adecuada para la transformación del ión en un derivado volatil que permita su determinación por cromatografía en fase gaseosa y detector de captura de electrones . En consecuencia, se ha transformado en BrCN, o bien, en $SCNCH_3$ y los cromatogramas obtenidos aconsejan utilizar en este trabajo el $SCNCH_3$ puesto que la reacción quimica, en la que se basa este procedimiento, es más sencilla y da resultados más sensibles que el BrCN.

- Las condiciones más adecuadas para el análisis cualitativo del $SCNCH_3$ se recogen en el capitulo II.3.2. y se han seguido en todo el trabajo experimental realizado. Se estudian diversos patrones internos para proceder al análisis cuantitativo del ión problema y, tras el ensayo de diversos derivados orgánicos como es el caso del 2-bromopropano, se ha terminado seleccionando el $SCNC_2H_5$

- Una vez seleccionada la reacción de metilación como la más adecuada, ha sido preciso un estudio más completo del procedimiento a fin de evitar las interferencias que plantea el exceso de reactivo metilante $SO_4(CH_3)_2$. Los

ensayos recogidos en los capitulos II.3.5. y II.3.6 nos permiten poner de manifiesto que una temperatura de 65ºC durante el proceso de metilación favorece la eliminación del exceso de $SO_4(CH_3)_2$.

- Se ha evaluado el rendimiento de la reacción de metilación en las condiciones antes citadas de temperatura y tiempo y el rendimiento medio es del orden de 88.56 y 88.25 %.

- Una vez puesto a punto el método analitico a seguir para la determinación de SCN^- en disoluciones puras se ha procedido a realizar unos ensayos en muestras naturales. La selección de las muestras se ha realizado en base a los vegetales ricos en el ión objeto de estudio y de consumo frecuente en zonas de bocio endemico. Las muestras se han desecado en todos los casos antes de proceder a su análisis. El contenido medio en agua de estos vegetales oscila entre 63,7 y 95,4 %.

- El ión SCN^- se puede liberar de los glucosidos de los que forma parte, según los autores consultados, tanto por hidrolisis quimica como enzimatica. En este trabajo

se han comparado los dos procedimientos hidrolíticos, y se realiza la determinación de SCN^- por cromatografía gas-líquido y detector de captura electrones . Se observa en todos los casos mayor rendimiento en la extracción cuando se utiliza tioglucosido glucohidrolasa (EC 2.3. 2.1.), lo que induce a pensar la acción selectiva de esta enzima sobre los tioglucosidos.

- La extracción y valoración de la tioglucosido glucohidrolasa (mirosinasa) se ha realizado según el método de Schwimmer (1961) a partir de polvo de mostaza amarilla (Sinapis alba). Se valora la enzima, por un método espectrofotométrico con una $K_m = 5.04 \cdot 10^{-2}$ M , y esto ha permitido en este trabajo utilizarlo como reactivo, ya que una vez extraida, se conservó mediante liofilización.

- Ensayos en blanco realizados con la enzima tioglucosido glucohidrolasa (mirosinasa), en los que se sustituyen las muestras problema por agua destilada, han demostrado que la enzima, por si misma, no aporta SCN^- al medio.

- Por último, a la vista de la Tabla resumen XII, se observa que las ppm de ión SCN^- presentes en los vegetales os

cilan entre 0.4692 y 97.7351 ppm en el caso de hidrolisis enzimatica y entre 0.1811 y 41.1221 ppm en el caso de hidrolisis química.

IV. CONCLUSIONES

1.- El $SCNCH_3$ es el derivado más adecuado para el análisis del ión SCN^- por cromatografia gas-líquido con detector de captura electronica y como patrón interno se propone el $SCNC_2H_5$.

2.- La reacción de metilación del ión SCN^- con $SO_4(CH_3)_2$ debe realizarse a reflujo y a una temperatura de 65ºC para evitarse de este modo cualquier tipo de interferencia. Bajo estas condiciones el rendimiento de la reacción es del orden del 88.40 %.

3.- Del análisis realizado en vegetales de amplio consumo en zonas de bocio endemico, se pone de manifiesto el alto contenido en ión SCN^- tanto en Cruciferas como otras familias vegetales (Umbeliferas, Solanaceas, Liliaceas, Quenopodiaceas, Cucurbitaceas y Compuestas).

4.- Tras estudios comparativos de la reacción hidrolitica para liberar el ión SCN^- de los tioglucosidos, se considera más conveniente la hidrolisis enzimatica ya que el rendimiento de la reacción es superior en un 331 %.

5.- Los ensayos en blanco realizados con la enzima tioglucosido glucohidrolasa (mirosinasa) demuestran que no interfieren en los resultados obtenidos ya que no libera SCN^- al medio.

6.- Los niveles de SCN^- determinados en vegetales sometidos a hidrolisis quimica oscilan entre 0,1811-41,1221 ppm mientras estos mismos vegetales analizados tras una hidrolisis enzimatica permiten calcular niveles de SCN^- que oscilan entre 0,4692-97,7351 ppm.

V.- BIBLIOGRAFIA

ABD EL-KADER A.K.; AHMED Y.Z. ; ABD EL MOTTAIB M.- "Spectrophotometric Determination of Thiosulfate, Thiocyanate and Thiourea ions by using sodium nitropruside as a complexing agent". Analytical Letters, 1984, 17, 2259-2266.

ALDRIDGE, W.M.- "A new method for the determination of micro". Analyst, 1944, 69, 262.

ANDERSEN, Donald L.- "Allyl Isothiocyanate in Mustard Seed". Journal of the AOAC, 1970, 53(1), 1-3.

AUGUSTIN CAMPOS, F.- "Estudio de compuestos bociogenos tiocianogeneticos presentes en alimentos de consumo habitual en zonas de la Alpujarra Granadina". Memoria de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Granada (1983).

AUBRY, J.C.; SWYSEN, M.; BASTENIER, H.; HEUSE, A.- "Method for determining urinary thiocyanates by a modified method of Lunquist". Arch. Belg. Med. Soc., Hyg., Med. Trav. Med. Ley, 1982, 40 (7-8), 321-330.

AYERS, G.P.;GILLET, R.W.- Sensitive detection of anions in ion chromatography using UV detection al wavelengths less than 200 nm". Journal of Chromatography, 1984, 284, 510-514.

BARZELLATO, J.; BECKERS, C.; STEVENSON, C.; COVARRUBIAS, E.; GIANETTI, E.; BOBADILLA, E.- "Endemic goiter in Pedregoso (Chile)". Acta Endocrinologica, 1967, 54, 577.

BERENS, S.C.; BERNSTEIN, R.S.; ROBBINS, J.; WOLFF,J.- "Antithyroid effects of lithium". Clin. Invest., 1970, 49, 1357.

BIBLE, Bernard B.; HAK-YOON, Ju ; CHONG, Calvin.- "Boron deficiency in relation to growth and thiocyanate toxin content of radish". Scientia Horticulturae, 1981, 15, 201-205.

BRABENDER, H.F.; VERBEKE, R.- "Determination of thiocyanate in tissues and body fluids of animals by gas chromatography with electron-capture detection". Journal of Chromatography, 1977, 138, 131-142

BURRIEL MARTI, F.; LUCENA CONDE, F.; ARRIBAS JIMENO, S.- "Química Analitica Cualitativa". Ed. Paraninfo. Madrid 1964.

CAPPELLETTI, P.; FRANCESCHIN, A.; LIPPI, U.- "Smoking and thiocyanate. I. In vitro effects of thiocyanate on 19 biochemical tests and electrophoretic pattern of serum proteins". Lab. J. Res. Lab. Med., 1982, 9 (5), 489-495.

CAPPELLETTI, P.; FRANCESCHIN, A.; LIPPI, U.- "Smoking and thiocyanate. II. In vitro effects of thiocyanate on the determination of 9 serum enzymes and 3 serum isoenzymes". Lab. J. Res. Lab. Med., 1982, 9 (5), 497-500.

CAPPELLETTI, P.; FRANCESCHIN, A.; LIPPI, U.- "Smoking and thiocyanate. III. Methods for serum thiocyanate determination. Elements of standardization". Lab. J. Res. Lab. Med., 1982, 9 (5), 501-508.

CAPPELLETTI, P.; FRANCESCHIN, A.; LIPPI, U.- "Smoking and thiocyanate. IV. The continous flow mechanized determination of the thiocyanate concentration in serum of 503 smokers and 676 non-smokers". Lab. J. Res. Lab. Med., 1982, 9 (5), 509-515.

CAPPELLETTI, P.; FRANCESCHIN, A.; LIPPI, U.- "Smoke and thiocyanate. V. Urinary concentration of thiocyanate in smokers and non-smokers". Lab. J. Res. Lab. Med., 1984, 11 (5), 455-459.

COWAN, J.W.; SAGHIR, A.R.; SALJI, J.P.- "Antithyroid activity of onion volatiles". Aust. J. Biol. Sci., 1967, 20, 683-685.

DANCHIK, Richard S.; BOLTZ, D.F.- "Indirect Spectrophotometric and Atomic Absorption Spectrometric Methods for determination of thiocyanate". Analytical Chemistry, 1968, 40 (14), 2215-2216.

DAY, T.K.; POWELL-JACKSON, P.R.- "Fluoride, Water hardness, and endemic goiter". The Lancet, 1972, 1135.

DAXENBICHLER, Melvin E.; Van ETTEN, Cecil.- "Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables: gas-liquid chromatographic determination of the aglucon de-derivatives from cabbage". Journal of the AOAC, 1977, 60 (4), 950-953.

DAXENBICHLER, Melvin E.; Van ETTEN, Cecil.; WILLIAMS, Paul.- "Glucosinolate products in commercial sauerkraut". J. Agric. Food Chem., 1980, 28, 809-811.

EPSTEIN, Joseph.- "Estimation of microquantities of cyanide". Analytical Chemistry, 1947, 19 (4), 272-274.

ERMANS, A.H.; DELANGE, F.; Van der VELDEN, M.; KINTHAERT, J. "Posible role of cyanide and thiocyanate in the etilogy of endemic cretinism in human developement and the thyroid gland". Editado por Stanbury and Kroc. Plenum Press, New York. 1972, 455.

FUNAZO, Koichi ; TANAKA, Minoru ; SHONO, Toshiyuki.- "Methylation of inorganic anions for gas chromatographic determination". Journal of Chromatography, 1981, 211 , 361-368.

GAITAN, Eduardo ; MEDINA, Pablo; De ROVEN, Timothy ; MAY SUN, Zia.- "Goiter prevalence and bacterial contamination of water supplies". J. Clinical Endocrinology and Metabolism, 1980, 51 (5), 957-959.

GAITAN, Eduardo ; COOKSEY, Robert C.; MATTHEWS, Donna ; PRESSON, Robert.- "In vitro measurament of antithyroid compounds and environmental goitrogens". J. Clinical Endocrinology and Metabolism, 1983, 56 (4), 767-773.

GREEN, William L.- "Mecanismo de acción de los compuestos antitiroideos ". Sidney C. Werner , Sidney H. Ingbar, El Tiroides. Ed. Salvat. 1977, 32-39.

GROOT, L.J. DE ; STANBURY, J.B.- "The Thyroid and Its Diseases ". John Wiley, New York. 1975, 496.

GROOT, L.J. DE - Endocrinology, 1982, I, 373-382.

HAK-YOON, Ju ; BIBLE, Bernard B.; CHONG, Calvin.- " Variation of thiocyanate ion content en cauliflower and broccoli cultivars ". J. Amer. Soc. Hor. Sci., 1980, 105 (2), 187-189.

HAK-YOON, Ju ; CHONG, Calvin ; BIBLE, Bernard B.; MULLIN W.J. " Seasonal variation in glucosinolate composition of Rutabaga and Turnip ". Can. J. Plan. Sci., 1980, 60 , 1295-1302.

HELIOVAARA, M.; KARVONEN, M.J.; PUNSAR, S.; RAUTANEN, Y.; HAAPAKOSKI, J.- " Serum thiocyanate concentration and cigarette smoking in relation to overall mortality and to deaths from coronary heart disease and lung cancer". J. Chrom. Dis., 1981, 34, 305-311.

HERSMAN, J.M.; DUE, D.T.; SHARP, B.; MY, L.; KENT, J.R.; BINH, L.N.; REED, A.W.; PHUC, L.D.; Van HERLE, A.J.; THAI, N.A.; TROUNG, T.X.; VAN, N.V.; SUGAWARA, M.; PEKARY, A.E.- " Endemic goiter in Vietnam ". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1983, 57 (2), 243-249.

HIROSUE, T.; KAWAI, H.; HOSOGAI, Y.- " Determination of thiocyanate (SCN) in food by Gas-chromatography with electron-capture detector ". Nippon Skokuhin Koggo Gakkaishi. 1983, 30 (5), 296-299.

IGAWA, Manabo ; SAITO, Kimiko ; TSUKAMOTO, Jun ; TANAKA , Masao.- "Ion Chromatographic separation of anions on silica-coated polyamide crown resin". Analytical Chemistry, 1981, 53, 1942-1944.

IWARSSON, K.; EKMAN, B.R.; EVERITT, L.; FIGUEIRAS,H.; NILSSON, P.O.- " The effect of feeding rapeseed meal on thyroid function and morphology in growing bulls ". Acta Veterinaria Scandinavica, 1973, 14, 1-20.

IWARSSON, K.- "Rapeseed meal as a protein supplement for dairy cows ". Acta Veterinaria Scandinavica, 1973, 14, 595-609.

JIMENEZ DE LA HIGUERA, A.- " Propuestas de modificación a la

téncica analítica de Aldridge para la determinación de tiocianato en suero humano ". Memoria de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Granada, 1985.

JOHNSTON, T.D.; JONES, D.I.H.- " Variations in the thiocyanate content of kale varieties ". J. Sci. Food Agric., 1966, 17, 70-71.

JOSEFSSON, E.- " Method for quantitative determination of p-hidroxybenzylisothiocyanate in digests of seed meal of Sinapis alba L. ". J. Sci. Food Agric., 1968, 19 , 192-194.

KRUSE, J.M.; MELLON, M.G.- " Colorimetric Determination of Cyanide and Thicyanate ". Analytical Chemistry, 1953, 25 (3), 446-450.

LARSEN, P.R.- " Salicylate induced increases in free triiodothyronine in human serum ". J. Clin. Invest., 1972, 51, 1125.

LINDNER, E.- " Toxicologia de los alimentos ". Ed. Acribia, 1978, 23-30.

LUNDQUIST, P.; MARTENSSON, J.; SORBO, B.,; OHMAN S.- " Method for determining thiocyanate in serum and urine ". Clinical Chemistry, 1979, 25 (5), 678-681.

McGREGOR, D.I.- " Thiocyanate ion, a hidrolysis product of glucosinolates from rape and mustard seed ". Can. J.

Plan. Sci., 1978, 58, 795-800.

McGREGOR, D.I.; MULLIN, W.J.; FENWICK, G.R.- " Review of analysis of glucosinolates ". Journal of the AOAC, 1983, 66 (4), 825-849.

MORGAN, Ronald L.; WAY, Jones L.- " Fluorometric Determination of cyanide in biological fluids with piridoxal ". Journal of Analytical Toxicology, 1980, 4, 78-81.

MULLIN, W.J.; SAHASRABUDHE, M.R.- " Glucosinolate content of cricuferous vegetable crops ". Can. J. Plant. Sci., 1977, 57, 1227-1230.

MUSA, B.U.; KUMAR, R.S.; DOWLING, J.T.- " Effects of salicylates on the distribution and early plasma disappearance of thyroxine in man ". J. Clin. Endo. & Metab., 1964, 28, 1461.

NAGASHIMA, Shigeru.- " Simultaneous reaction rate spaectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate by use of the pyridine-barbituric acid method ". Anal. Chem., 1984, 56, 1944-1947.

NEIL, L.J.; BIBLE, B.- " Thiocyanate ion (SCN^-) content of hipocotyl-root region of Raphanus sativus as affected by environment ". J. Sci. Food Agric., 1972, 23, 1379-1382.

PARRAS MASA, M.P.- " Aplicación de resinas de cambio ionico

a la determinación de tiocianato en medios biologicos". Memoria de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Granada. 1987.

RODRIGUEZ POYO-GUERRERO, P.; CAMARERO ONTORIA, A.; SUBIRON BARTOLOME, J.; PATO CASTEL, I.- "Etiopatogenia del bocio" . Endocrinologia, 1985, 32, 25-33.

SAGHIR, A.R.; COWAN, J.W.; SALJI, J.P.- "Goitrogenic activity of onion volatiles". Nature, 1966, 2, 87.

SAGHIR, A.R.; COWAN, J.W.; SALJI, J.P.- "The molecular structure of sulphides in relation to antithyroid activity". European Journal of Pharmacology, 1968, 2, 399-402.

SCHREYEN, L.; DIRINCK, F.; Van VASSEN HOVE, F.; SCHAMP, N.- "Volatile flavor components of leek". J. Agric. Food Chem., 1976, 24 (2), 336-339.

SCHWIMMER, Sigmund.-"Spectral changes during the action of myrosinase on sinigrin". Acta Chemica Scandinavica, 1961, 15, 535-544.

SHUAIB, Ahmed; BESWICK, Gordon ; TOMLINS, Richard I.- " The detection of the thiocyanate ion (SCN^-) in hen's egg by gas chromatography ". J. Sci. Food Agric., 1979, 30, 299-304.

SHUAIB, Ahmed ; BESWICK, Gordon ; TOMLINS, Richard I.- "The

thiocyanate ion (SCN^-) content of eggs hens (Gallus domesticus) fed on a diet containing rapeseed meal". J. Sci. Food Agric., 1981, 32, 347-352.

SUZUKI, H.- " Etiology of endemic goitre and iodide excess ". The Lancet, 1980, 237-253.

VELDEN, M. Van der ; KINTHAERT, J.; ORTS, S.; ERMANS, A.M.- "A preliminary study on the action of cassava on thyroid iodine metabolism in rats". Br. J. Nutr., 1973, 30, 511-517.

VIRION, Alain ; DEME, Daniele ; POMMIER, Jacques ; NUNEZ, Jacques.- "Opposite effects of thiocyanate on tyrosine iodation and thyroid hormone synthesis". Eur. J. Biochem. 1980, 112, 1-7.

WETTER, L.R.; YOUNGS, C.G.- "A thiourea-UV assay for total glucosinolate content in rapeseed meals". Journal of the american oil chemists' society, 1976, 53 (4), 162-164.

WOLFF, J.; STANDAERT, M.E.; RALL, J.E.-"Thyroxine displacement from serum proteins and depression of serum protein-bound iodine by certein drugs". J. Clin. Invest., 1961, 40, 1373.

YOUNGS, C.G.; WETTER, L.R.- "Microdetermination of the major individual isothiocyanates and oxazolidinethione in rapeseed". The Journal of the american oil chemists' society, 1967, 44 (105, 551-554.