

DETERMINACIÓN DE pKas DE AMINOTIOLES DE BAJO PESO MOLECULAR Y RELACIÓN DE BRØNSTED CON UNA REACCIÓN DE ALQUILACIÓN



MARÍA VICTORIA TOURN RECH
TUTOR: DR. GERARDO FERRER-SUETA

TRABAJO ESPECIAL II – LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE FISCOQUÍMICA BIOLÓGICA – ENZIMOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
JULIO DE 2014

CONTENIDO

1. ÍNDICE DE FIGURAS y ESQUEMAS	4
2. ÍNDICE DE TABLAS	6
3. LISTA DE ABREVIATURAS	7
4. INTRODUCCIÓN	8
5. OBJETIVOS	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	13
7. RESULTADOS:.....	16
I. Evaluación de la absorción del sistema de amortiguación en el intervalo de pH de interés entre 230 y 250 nm.	16
Control negativo: titulación de la solución amortiguadora ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 µM.....	18
II. Validación del método.....	19
Titulación de 2-mercaptoetanol con NaOH 0.2 M.....	19
III. Titulación de aminotioles de bajo peso molecular y determinación de las constantes microscópicas de acidez.	21
cisteína etil éster, L-cisteína y L-cisteinil-glicina	22
cisteína etil éster	22
L-cisteína	22
L-cisteinil-glicina	22
glutación reducido (GSH).....	26
homocisteína.....	29
cisteamina HCl.....	31
IV. Determinación de las constantes de velocidad independientes de pH de algunos aminotioles para la reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr).	34
cisteína-etil éster.....	35
L-cisteína:	36
glutación reducido (GSH).....	37

V. Determinación de la relación de Brønsted de algunos aminotioles para la reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr).	39
8. CONCLUSIONES:.....	41
9. REFERENCIAS:.....	42

1. ÍNDICE DE FIGURAS y ESQUEMAS

Esquema 1. Estados de protonación del glutatión a pH neutro.....	10
Esquema 2. Equilibrios ácido-base de un aminotiol de bajo peso molecular en el rango de pH 6.00-12.00.....	10
Figura 1. Espectros de absorción del sistema amortiguador ACES 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 µM.....	16
Figura 2. Espectros de absorción del sistema amortiguador ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 µM.	17
Figura 3. Datos obtenidos durante la titulación de la solución amortiguadora ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 µM con NaOH 0.2 M. ...	18
Figura 4. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de 2-mercaptoetanol 200 µM con NaOH 0.2 M.	19
Figura 5. Distribución de especies de 2-mercaptoetanol en el rango de pH de interés.	20
Figura 6. Espectros de absorción obtenidos durante la titulación de cisteína-etil-éster 150 µM con NaOH 0.2 M.....	21
Figura 7. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de cisteína etil éster 150 µM con NaOH 0.2 M.	23
Figura 8. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de L-cisteína 150 µM con NaOH 0.2 M.....	23
Figura 9. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de L-cisteinil-glicina 200 µM con NaOH 0.2 M.	24
Figura 10. Distribución de especies de cisteína etil éster en el rango de pH 5.00-11.00.....	25
Figura 11. Distribución de especies de L-cisteína en el rango de pH de interés	25
Figura 12. Distribución de especies de L-cisteinil-glicina en el rango de pH de interés.....	26
Figura 13. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de glutatión reducido 200 µM con NaOH 0.2 M.....	27
Figura 14. Gráficos residuales del ajuste a la ecuación (10) (■) y a la ecuación (11).....	28
Figura 15. Distribución de especies de glutatión reducido (GSH) en el rango de pH de interés.	29
Figura 16. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de homocisteína 200 µM con NaOH 0,2 M.	30
Figura 17. Distribución de especies de homocisteína en el rango de pH de interés.	31
Figura 18. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de cisteamina 200 µM con NaOH 0,2 M.....	32

Figura 19. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de cisteamina 200 μ M con NaOH 0.2 M.....	33
Figura 20. Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden con el pH para la reacción de cisteína-etil éster con mBBr.....	35
Figura 21. Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden con el pH para la reacción de cisteína con mBBr.	36
Figura 22. Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden con el pH para la reacción de GSH con mBBr.	37
Figura 23. Gráfico de correlación de Brønsted para distintos tioles de bajo peso molecular con la reacción de alquilación con mBBr a 37°C.....	40

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de pKa obtenidos experimentalmente y valores de pKa obtenidos de NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes.	11
Tabla 2. Valores de absorbancia máximo obtenidos en el rango entre 230 y 250 nm para los dos sistemas amortiguadores ensayados y en distintas condiciones.	17
Tabla 3. Resultados de valor de pKa obtenidos experimentalmente para 2-mercaptoetanol en comparación con el de bibliografía.	20
Tabla 4. Resultados de valores de pKa obtenidos experimentalmente para cisteína etil éster, L-cisteína y L-cisteinil glicina en comparación con los de bibliografía.	24
Tabla 5. Valores de pKa obtenidos en el ajuste a la ecuación (11) para L-Glutatión reducido (GSH) en comparación con el de bibliografía.	27
Tabla 6. Valores de pKa obtenidos en el ajuste a la ecuación (10) para L-Glutatión reducido (GSH) en comparación con los de bibliografía.	28
Tabla 7. Valores de pKa obtenidos experimentalmente para cisteamina HCl en comparación con el de bibliografía.	32
Tabla 8. Resultados de valores de constante de velocidad independiente de pH de cisteína etil éster, L-cisteína y L-glutatión para la reacción con mBBr a 37°C obtenidos a partir del ajuste de los datos a la ecuación (15) en comparación con los de bibliografía.	38
Tabla 9. Datos considerados para la determinación del coeficiente de Brønsted.	39

3. LISTA DE ABREVIATURAS

μ :	fuerza iónica
2-ME:	2-mercaptoetanol
ACES:	ácido <i>N</i> -(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico
Cys EE:	cisteína-etil éster
DMSA:	ácido dimercaptosuccínico
DTPA:	ácido dietilentriaminopentaacético
GS:	glutación desprotonado
GSH:	glutación reducido
HCl:	ácido clorhídrico
Ka:	constante de disociación ácida
mBBr:	Monobromobimano
N-acetil-Cys:	N-acetil-cisteína
NaCl:	cloruro de sodio
NaOH:	hidróxido de sodio
O ₂ :	oxígeno molecular
RS ⁻ :	grupo tiolato
RSH:	grupo tiol protonado
ϵ :	coeficiente de extinción molar

4. INTRODUCCIÓN

La reactividad del grupo tiol permite el rol de los residuos de cisteína como donadores de electrones, formadores de enlaces disulfuro y coordinadores de iones metálicos, a la vez que determina su alta sensibilidad a modificaciones post-traduccionales por parte de oxidantes y electrófilos. (1)

Está generalmente aceptado que en sistemas celulares, tanto el intercambio tiol-disulfuro como las reacciones redox son procesos dinámicos no equilibrados, por lo que son controlados cinética, y no termodinámicamente. (2)

Las reacciones bioquímicas de tioles se caracterizan en que la reactividad del grupo tiol proteico involucra generalmente un ataque nucleofílico del tiolato (RS^-) de una cisteína sobre un grupo electrófilo.

La nucleofilicidad se restringe a un fenómeno cinético, en referencia a la capacidad cinética de un grupo nucleofílico en un proceso de sustitución o combinación. Por otro lado, la basicidad es un término termodinámico, en referencia a la habilidad de una base de Brønsted de remover un protón de un donador de protones (un ácido de Brønsted). (3)

La nucleofilicidad del tiolato (RS^-) es varios órdenes de magnitud mayor que la de su ácido conjugado, el tiol (RSH). Dado que la mayoría de los tioles tienen pKas en el rango entre 6 y 8, en condiciones fisiológicas se encuentra disponible sólo una fracción como tiolato, por lo que la constante de disociación (K_a) es una propiedad importante a conocer para proponer un mecanismo de reacción y comparar reactividades entre distintos tioles. (4-5)

Dada la reacción:



$$K_a = ([RS^-] + [H^+]) / [RSH] \quad (2)$$

En vez de la constante de acidez (K_a), se utiliza habitualmente la función $pK_a = -\log K_a$.

Sin embargo, la nucleofilicidad del grupo tiol en los sistemas proteicos se ve afectada por otros múltiples factores, propios de la complejidad de estos sistemas, como por ejemplo: (4)

- Propiedades estructurales y moleculares del nucleófilo: basicidad, polarizabilidad y presencia de electrones libres en el átomo adyacente al átomo nucleofílico.

- Factores propios del ambiente del nucleófilo: solvatación, impedimentos estéricos, enlaces de hidrógeno y formación de estados de transición cíclicos, siendo mayormente afectados por el entorno proteico.

Dada esta complejidad, la caracterización de la acidez y nucleofilia de tioles de bajo peso molecular en sistemas aislados es un buen punto de partida para el estudio de los mismos en sistemas más complejos, como las proteínas.

Con el fin de comparar reactividad entre tioles se utilizarán las constantes de velocidad independientes de pH (k_{RS^-}) correspondientes a la siguiente reacción general (2):



El valor numérico de k_{RS^-} puede calcularse según:

$$k_{RS^-} = k_{app}^{pH} [(K_a^{RSH} + [H^+]) / K_a^{RSH}] \quad (4)$$

donde K_a^{RSH} es la constante de ionización del tiol y k_{app}^{pH} es la constante de velocidad de la reacción a un valor de pH determinado.

Experimentalmente, es posible extrapolar k_{RS^-} ajustando los datos de k_{app}^{pH} obtenidos a valores de pH cercanos al pKa del tiol a la ecuación (4).

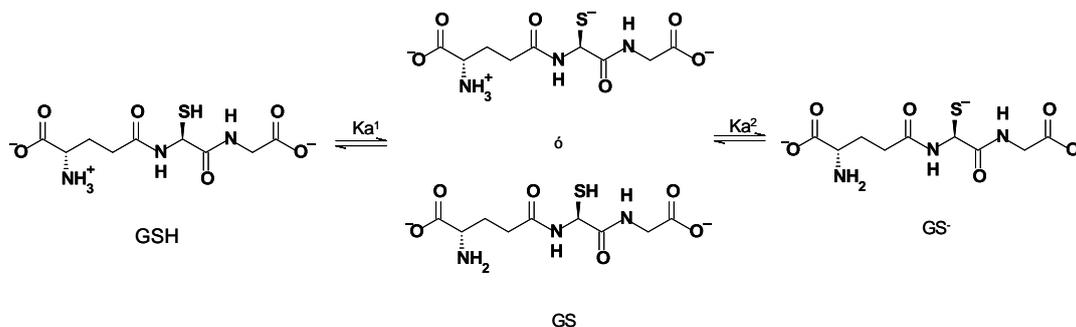
Asimismo, es posible establecer una relación lineal empírica entre nucleofilicidad (k_{RS^-}) y basicidad (pK_a), representada usualmente por una relación de Brønsted de la siguiente forma:

$$\log k_{RS^-} = \beta_{Nuc} pK_a^{RSH} + C \quad (5)$$

donde β_{Nuc} es la constante nucleofílica de un tiol determinado para una reacción determinada.

En la literatura disponible, los valores de β_{Nuc} se encuentran entre 0 y 1, por lo que la nucleofilicidad se mantendría constante o se incrementaría con la basicidad del tiolato (pK_a), pero nunca disminuiría. (4)

Con respecto a la basicidad, el estado de protonación de un grupo funcional en un ácido poliprótico se caracteriza por las constantes de disociación microscópicas de cada uno de los grupos ácidos. Para el glutatión, por ejemplo, los dos grupos carboxílicos se encuentran desprotonados a pH neutro, por lo que se supone que sus valores de pK_a no influyen en la cinética de sus reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Sin embargo, los grupos terminales amino y sulfhidrilo se encuentran mayoritariamente en sus formas protonadas a pH neutro, resultando en dos protones lábiles para el glutatión reducido (GSH), según se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 1. Estados de protonación del glutatión a valores de pH > pH neutro.

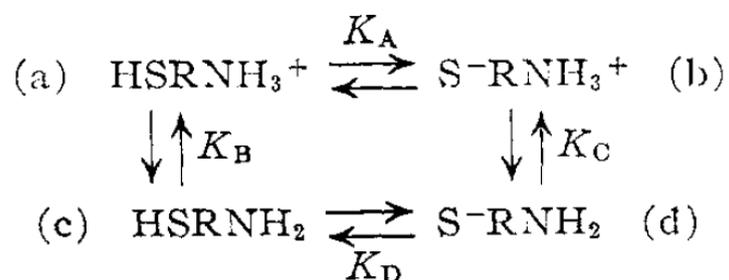
Siendo K_{a1} y K_{a2} las constantes de disociación macroscópicas que determinan el estado de protonación general del glutatión a valores de pH > pH neutro.

Sin embargo, no es posible asignar cada una de estas constantes de equilibrio a un grupo funcional determinado, porque GS representa una mezcla de dos isómeros de protonación, donde el protón puede encontrarse unido al grupo tiol o al grupo amino del glutatión.

Por lo tanto, para estudiar la nucleofilicidad de un aminotiol es necesario determinar las constantes de disociación microscópicas con el fin de calcular las concentraciones de las distintas especies tiolato involucradas. (2, 6)

Benesch y Benesch (7) estudiaron la acidez y calcularon la concentración relativa de todas las especies presentes en el rango de pKa de interés (el del tiol), para 7 aminotioles de bajo peso molecular, determinando sus constantes de disociación microscópica experimentalmente.

La relación de equilibrios se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Equilibrios ácido-base de un aminotiol de bajo peso molecular en el rango de pH 6.00-12.00. a, b, c y d son las concentraciones de especies presentes, mientras que K_A , K_B , K_C y K_D son las constantes de disociación microscópicas. (7)

De la relación de equilibrios del Esquema 2 se desprende que $K_A / K_B = K_D / K_C$. (7)

La relación de equilibrios del Esquema 2 permite determinar la siguiente ecuación de ajuste para el cálculo de las constantes de disociación microscópicas:

$$[RS^-] / [RS^-]_{\text{total}} = (b+d) / (a+b+c+d) = (K_A / K_B + K_D/[H^+]) / ([H^+]/ K_B + K_A / K_B + K_D/[H^+] + 1) \quad (8)$$

Los autores supusieron que los coeficientes de extinción molar de las formas tiolato se mantienen, independientemente del estado de protonación del grupo amino.

Una vez determinadas las cuatro constantes de disociación microscópicas es posible utilizar la ecuación (8) para conocer la concentración relativa de cada una de las especies presentes en función del pH.

Por otro lado, en su tesina de grado, Sardi (8) determinó, entre otras cosas, las constantes de velocidad independientes de pH de varios tioles de bajo peso molecular en su reacción con monobromobimano a 37°C, en un rango de pH entre 6 y 12 y en condiciones de fuerza iónica constante ($\mu = 0,15$), obteniendo una relación de Brønsted de la siguiente forma:

$$\log k_{RS^-} = 0,40 \text{ p}K_a^{\text{RSH}} - 0,96 \quad (9)$$

En su trabajo la autora observó que las curvas de titulación de algunos tioles ajustaban a una función de dos pKa, quedando en evidencia la presencia de comportamientos ácido-base de otro grupo, aparte del tiol, en las condiciones del experimento. Las constantes de velocidad independientes de pH fueron determinadas a partir de estas constantes de disociación macroscópicas. Los compuestos que presentaron este comportamiento fueron todos aminotioles y se incluyen en la Tabla 1.

Tiol de bajo peso molecular	pKa (literatura)	pKa (experimental)	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
Cisteína-etil éster (Cys EE)	6.6	6.99	72.9
		9.13	1070.5
cisteamina	8.2	8.16	176.6
		11,27	1737,7
cisteína (Cys)	8.3	7.98	124
		10.57	1494
glutación (GSH)	8.8	7.99	64.95
		10.18	1126
2-mercaptoetanol (2-ME)	9.5	9.74	775.1

Tabla 1. Valores de pKa obtenidos experimentalmente y valores de pKa obtenidos de NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes. Adaptado de: (8)

El ajuste de los resultados cinéticos obtenidos por la autora a las constantes microscópicas de acidez de cada tiolato involucrado es el marco de referencia para este trabajo.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la distribución de especies tiolato presentes para cada tiol de bajo peso molecular ensayado, en base a las constantes de disociación determinadas en las condiciones experimentales.

Establecer la relación de Brønsted de varios aminotioles de bajo peso molecular.

Objetivos específicos:

- Determinar los pKas microscópicas de cada una de las especies tiolato presentes en las condiciones del experimento.
- Determinar las constantes de velocidad independientes de pH de la reacción de algunos aminotioles de bajo peso molecular con monobromobimano (mBBR) a 37°C.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

Todas las titulaciones se realizaron en Espectrofotómetro VARIAN CARY 50 Tablet – UV-Vis Spectrophotometer, en cubeta de cuarzo de 4 mL y el pH se midió directamente en la cubeta con un microelectrodo THERMO FISHER SCIENTIFIC – ORION PRODUCTS – DJ Glass Ag/AgCl Micro pH Electrode.

Se seleccionó el sistema amortiguador: ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 μ M para cumplir las siguientes condiciones:

- mantener la fuerza iónica constante ($\mu = 0.15$) en el intervalo de pH de interés (entre 6.00 y 12.00) a temperatura ambiente.
- ser unas diez veces más concentrado que el analito.
- ser por lo menos 10 veces más concentrado que los protones presentes en solución a un valor de pH determinado.

Aunque este sistema de tres componentes no presenta variaciones significativas de la fuerza iónica a concentraciones dadas (9), como los sustratos a ensayar no son sensibles a la presencia de electrolito se utilizó NaCl como contribuyente principal de la fuerza iónica del sistema, con el fin de utilizar concentraciones menores de los componentes del amortiguador.

Originalmente, se consideró utilizar el sistema amortiguador de Ellis (9), con los mismos componentes y concentraciones que el seleccionado excepto que utilizando ACES en vez de ácido acético. Sin embargo, producto de la evaluación de la absorbancia del sistema amortiguador en el rango de pH de interés, se decidió sustituir el ACES por ácido acético, tal como se detallará en la sección Resultados.

Con el fin de calcular el volumen necesario para neutralizar el sistema, se supuso que todos los protones presentes son aportados por el ácido acético y que el volumen del sistema es igual al volumen de cubeta disponible (4 mL). Se decidió utilizar una solución de NaOH 0.2 M, estimando el volumen necesario para neutralizar el sistema a 100 µL y asegurando buena resolución al experimento.

Salvo expresas excepciones, todas las mediciones se realizan en atmósfera pobre en O₂, gaseando el sistema con argón. Las mediciones espectrofotométricas se realizan corrigiendo la absorbancia por la línea de base correspondiente a la solución amortiguadora acidificada.

Previo al agregado del tiol, el sistema se gasea durante 30 minutos. El tiol a ensayar se prepara 100X por lo que a 4 mL de buffer se agrega una alícuota de 0.04 mL de solución de tiol (150-200 µM final). El espectro de absorción y el valor de pH se miden inmediatamente después de un agitado rápido y gaseado durante 1 minuto. Como los valores reportados de pH deben ser aquellos determinados en las mezclas de reacción y a la temperatura de reacción (9) se mide el pH en el sistema directamente en la cubeta utilizando un microelectrodo.

La titulación se lleva a cabo agregando alícuotas de 5 µL, obteniendo el espectro de absorción y midiendo el valor de pH inmediatamente después de un agitado rápido y gaseado durante 1 minuto luego del agregado de cada alícuota. Todas las lecturas se realizan a temperatura ambiente.

Como se desconocen los valores de los coeficientes de extinción molar de los aminotioles a ensayar, lo que imposibilita graficar la fracción disociada, para ajustar los datos obtenidos fue necesario transformar la ecuación (8) en:

$$y = [10^{(-pK_A + pK_B)} + 10^{(-pK_D + x)}] / [10^{(-pK_A + pK_B)} + 10^{(-pK_D + x)} + 10^{(-x + pK_B)} + 1] \times P + b \quad (10)$$

En el caso de ajuste a un único pKa, la ecuación de ajuste utilizada fue la siguiente:

$$y = [1 + (10^{(-x)} / 10^{(-pK_A)})]^{(-1)} \times P + b \quad (11)$$

Siendo, para ambas ecuaciones, P el valor de absorbancia correspondiente a la totalidad del tiol en forma tiolato, y b la absorbancia de partida.

Benesch y Benesch observaron que los coeficientes de extinción molar (ϵ) de los tioles de bajo peso molecular ensayados se encontraban entre 4000 y 6000 M⁻¹s⁻¹. Dados estos valores de ϵ , una concentración de 200 µM de sustrato resulta un buen punto de partida, siendo los valores máximos de absorbancia esperados entre 0.8-1.2.

Por otro lado, dado que los autores notaron que la posición de los máximos de absorción se desplazaba hacia longitudes de onda menores conforme disminuía el pH

(de 236-238 nm a 230-232 nm para Cys), para el ajuste a la ecuación (10) se utiliza el máximo de absorbancia obtenido en el rango 230-250 nm, para cada valor de pH considerado.

Se utilizó 2-mercaptoetanol, el cual presenta un único grupo desprotonable en el rango de pH de interés, para validar el método y como control negativo la titulación de la solución amortiguadora.

Los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos de:

La L-cisteína y el L-glutati3n reducido (GSH) son Sigma, el 2-mercaptoetanol es Sigma-Aldrich, la cisteamina HCl, el ACES, el Tris, la etanolamina y el NaCl son Applichem, el DTPA es Acr3s Organics y la cisteína-etil 3ster es Aldrich.

El gas arg3n fue provisto por Linde y las soluciones patr3n de pH por Applichem.

Todas las soluciones se realizaron con agua calidad mRO.

7. RESULTADOS:

I. Evaluación de la absorción del sistema de amortiguación en el intervalo de pH de interés entre 230 y 250 nm.

Como se utilizó un método espectrofotométrico, se debió evaluar la absorción del sistema de amortiguación en el intervalo de pH de interés y a las longitudes de onda a medir. El rango de pH de trabajo se extendió entre 4.5 y 12, por lo que se debía estudiar la absorbancia del sistema amortiguador cercana a los límites de este rango. Para lograr estas condiciones se adicionaron 5 μL de ácido clorhídrico 2 M o 5 μL de hidróxido de sodio 2 M al sistema amortiguador.

La Figura 1 muestra el espectro de absorción del sistema de amortiguación elegido en función de la longitud de onda.

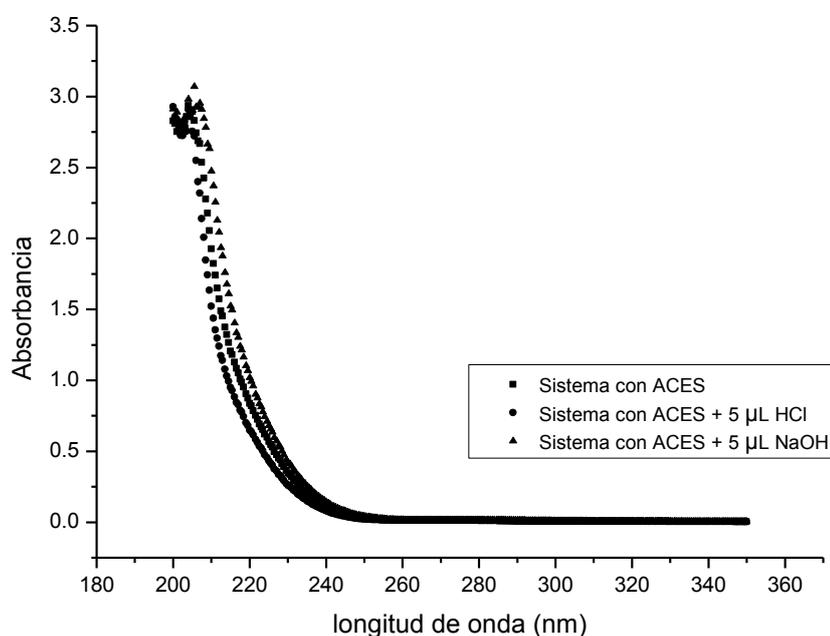


Figura 1. Espectros de absorción del sistema amortiguador ACES 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 μM .

En el rango de longitud de onda de interés (230-250 nm) se observó que el sistema amortiguador elegido presentaba máximos de absorbancia significativos, de entre 0.25 y 0.42, variando según su valor de pH.

Estimando que la contribución más significativa a la absorbancia del sistema estaba dada por el ACES, se decidió sustituir éste por ácido acético en el sistema amortiguador. La Figura 2 muestra el espectro de absorción del sistema de amortiguación con ácido acético en función de la longitud de onda.

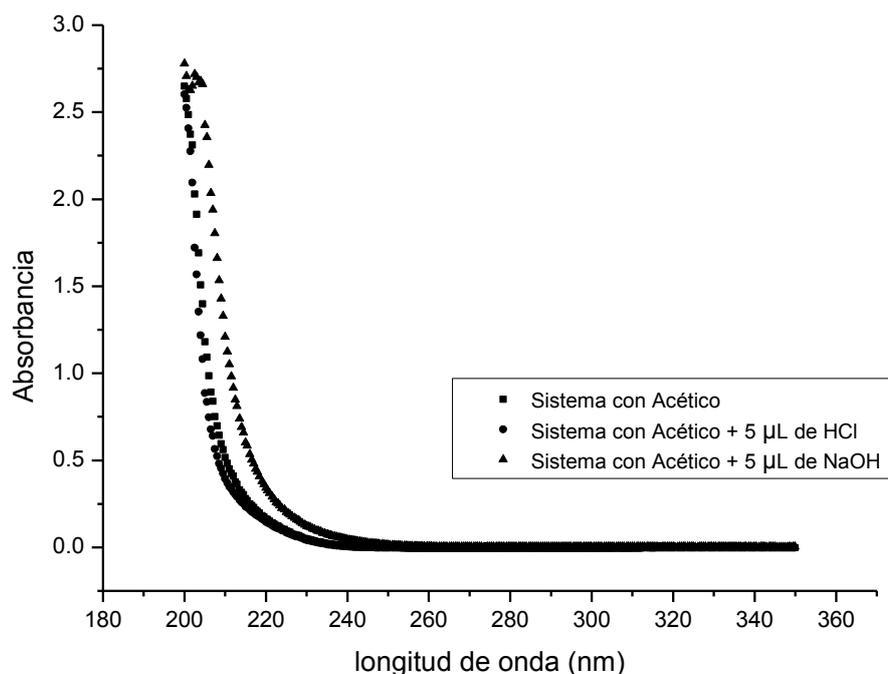


Figura 2. Espectros de absorción del sistema amortiguador ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCL 145 mM y DTPA 100 µM.

Si bien en ambos sistemas amortiguadores la absorbancia fue mayor a valores de pH mayores, la absorbancia del sistema con ácido acético se consideró despreciable en el rango de pH de interés. La Tabla 2 incluye los valores de absorbancia máximos en el rango 230-250 nm para cada una de las situaciones ensayadas.

Tipo de sistema amortiguador:	Absorbancia máxima entre 230 y 250 nm
Sistema con ACES	0,34506
Sistema con ACES + 5 µL de HCl 2M	0,25972
Sistema con ACES + 5 µL de NaOH 2M	0,42087
Sistema con ácido acético	0,04559
Sistema con ácido acético + 5 µL de HCl 2M	0,03997
Sistema con ácido acético + 5 µL de NaOH 2M	0,11872

Tabla 2. Valores de absorbancia máximo obtenidos en el rango entre 230 y 250 nm para los dos sistemas amortiguadores ensayados y en distintas condiciones.

Dados estos resultados, se decidió utilizar el sistema amortiguador ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 μ M para todos los ensayos.

Control negativo: titulación de la solución amortiguadora ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 μ M

En la Figura 3 se incluye la titulación de la solución amortiguadora.

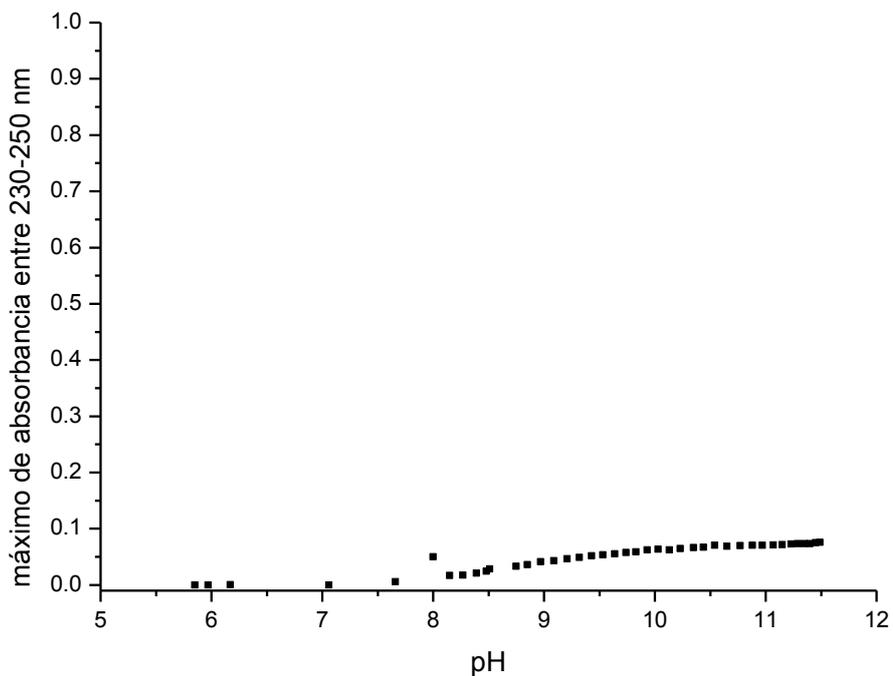


Figura 3. Datos obtenidos durante la titulación de la solución amortiguadora ácido acético 5mM, Tris 2.6 mM, etanolamina 2.6 mM, NaCl 145 mM y DTPA 100 μ M con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros.

Los máximos de absorbancia de la solución amortiguadora en el rango de pH de interés se consideran despreciables, aprobándose el control negativo del método.

II. Validación del método.

Titulación de 2-mercaptoetanol con NaOH 0.2 M



Como muestra su estructura química, el 2-mercaptoetanol no contiene un grupo amino, por lo que se esperaba que se comportara como un ácido monoprótico en el rango de pH de interés.

Un ejemplo de ajuste de los datos obtenidos a la ecuación de ajuste se incluye en la Figura 4.

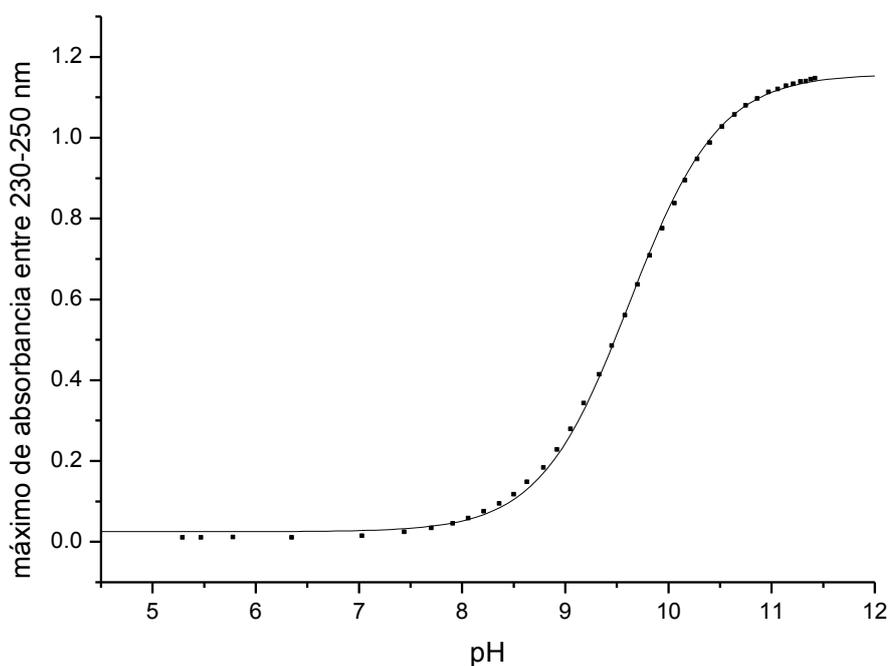


Figura 4. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de 2-mercaptoetanol 200 μM con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos mientras que la curva de ajuste a la ecuación (11) se muestra en línea entera. El pKa obtenido fue: $\text{pKa} = 9.62 \pm 0.01$.

Los pKas calculados a partir de la ecuación de ajuste son comparables a los obtenidos por Sardi (8) y se incluyen en la Tabla 3.

AJUSTE A 1 pKa						
	EXPERIMENTAL					BIBLIOGRAFÍA (8)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	SD	promedio	
pKa	9.62	9.60	9.62	0.01	9.61	9.74

Tabla 3. Resultados de valor de pKa obtenidos experimentalmente para 2-mercaptoetanol en comparación con el de bibliografía.

En base al valor de pKa obtenido es posible determinar la distribución de especies para un valor de pH dado. Esta distribución se incluye en la Figura 5.

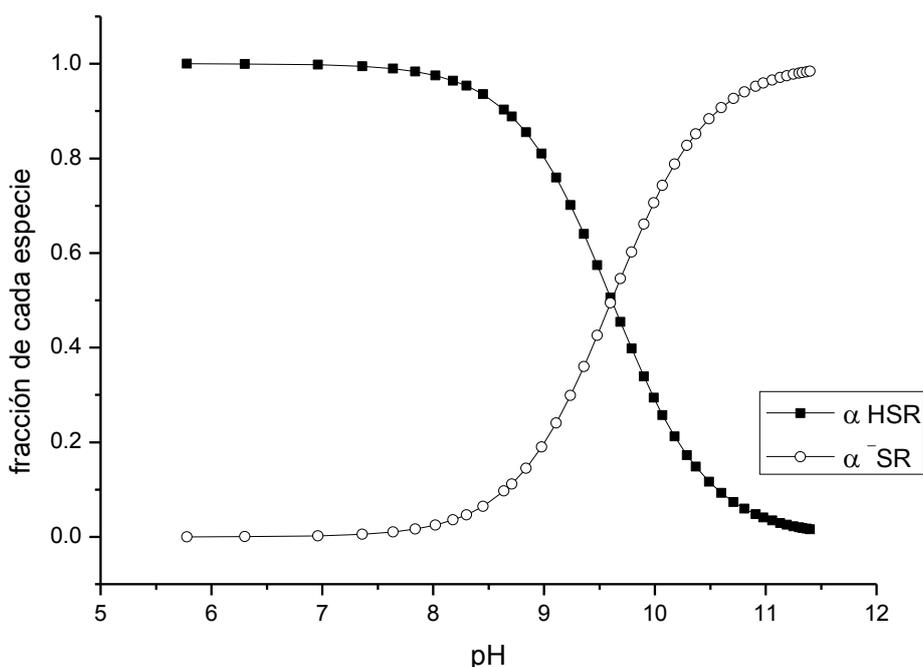


Figura 5. Distribución de especies de 2-mercaptoetanol en el rango de pH de interés.

Los resultados obtenidos verifican que el 2-mercaptoetanol se comporta como un ácido monoprótico, por lo que el método seleccionado resulta adecuado para el objetivo de determinación de las constantes de disociación microscópicas de los aminotioles a ensayar.

III. Titulación de aminotioles de bajo peso molecular y determinación de las constantes microscópicas de acidez.

Para todos los aminotioles y tioles ensayados, los espectros de absorción durante la titulación presentaron apariencia similar. En la Figura 6 se incluye una titulación de cisteína etil éster como ejemplo.

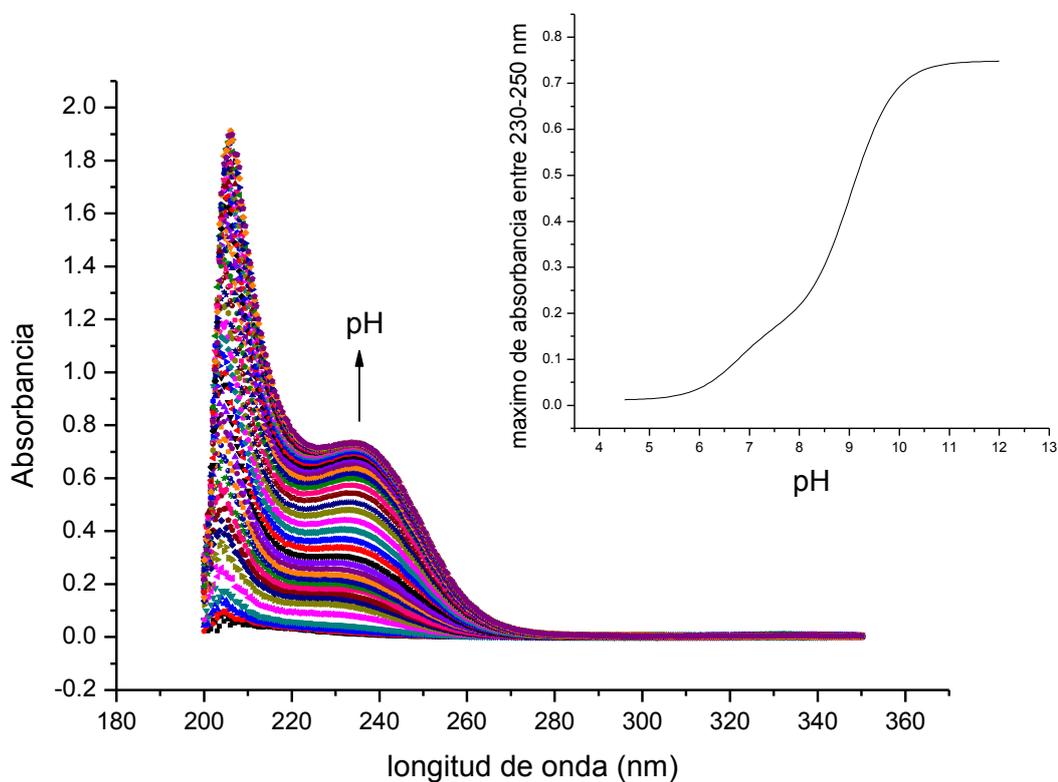
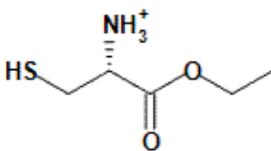
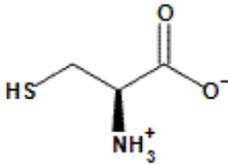
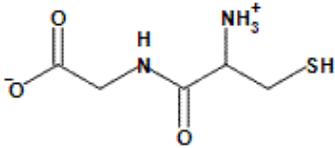


Figura 6. Espectros de absorción obtenidos durante la titulación de cisteína-etil éster 150 μM con NaOH 0.2 M. El inserto muestra la curva ajustada del perfil de titulación obtenido para el mismo experimento.

cisteína etil éster, L-cisteína y L-cisteinil-glicina

cisteína etil éster	
L-cisteína	
L-cisteinil-glicina	

Un ejemplo de ajuste de los datos obtenidos a la ecuación (10) para cada aminotiol se incluye en las figuras 7, 8 y 9.

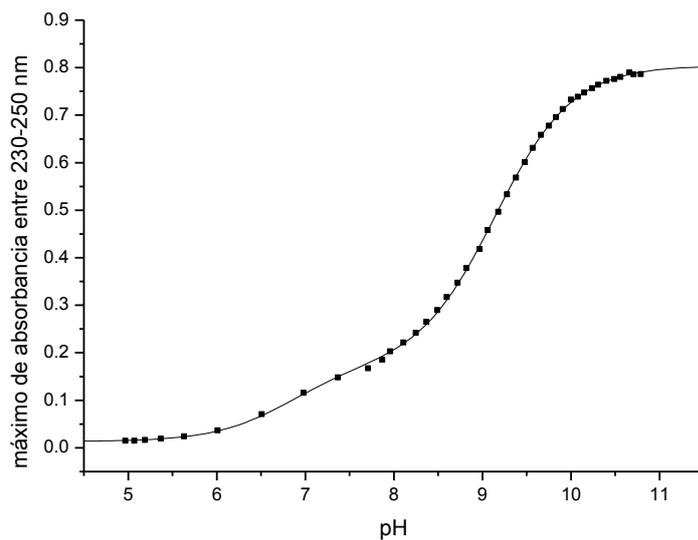


Figura 7. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de cisteína-etil éster 150 μM con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera. Los pKas obtenidos fueron: $\text{pK}_A = 7.50 \pm 0.04$; $\text{pK}_B = 6.92 \pm 0.04$; $\text{pK}_D = 9.05 \pm 0.01$; $\text{pK}_C = 8.35$ (calculado a partir de la ecuación (7)).

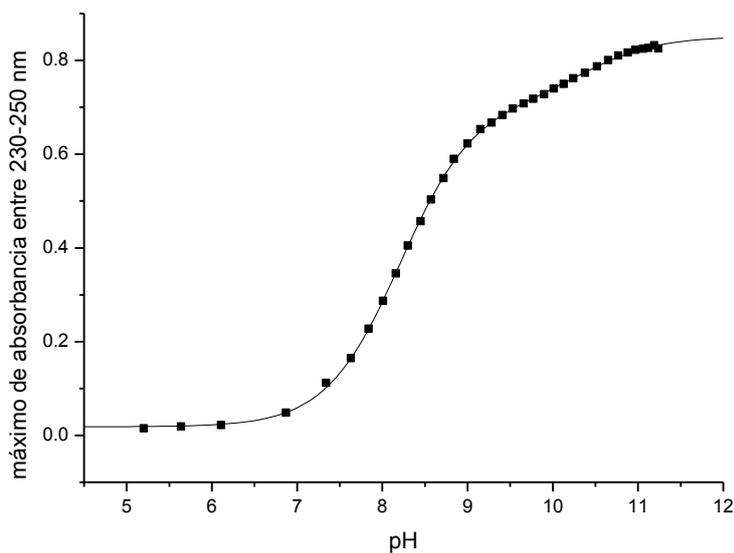


Figura 8. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de L-cisteína 150 μM con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera. Los pKas obtenidos fueron: $\text{pK}_A = 8.28 \pm 0.01$; $\text{pK}_B = 8.97 \pm 0.01$; $\text{pK}_D = 9.64 \pm 0.04$; $\text{pK}_C = 10.44$ (calculado a partir de la ecuación (7)).

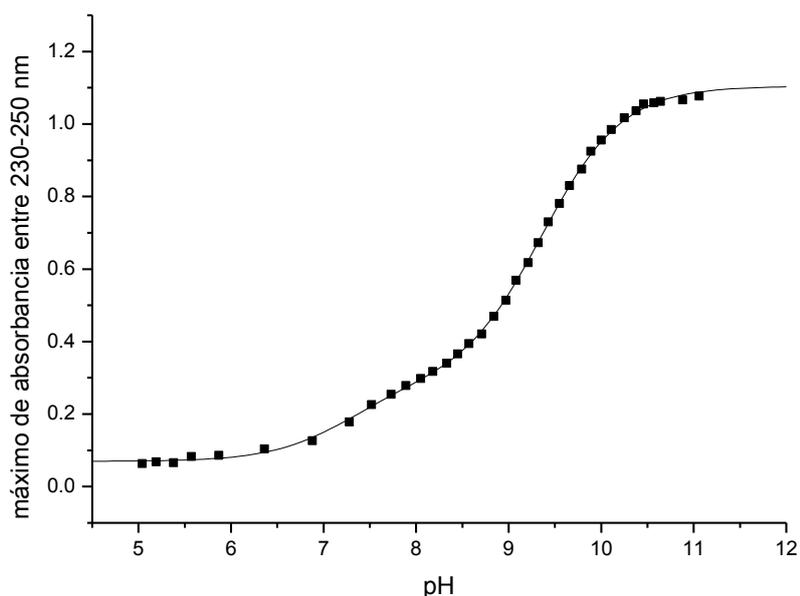


Figura 9. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de L-cisteinil-glicina 200 μM con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera. Los pKas obtenidos fueron: $\text{pK}_A = 7.93 \pm 0.04$; $\text{pK}_B = 7.37 \pm 0.05$; $\text{pK}_D = 9.26 \pm 0.01$; $\text{pK}_C = 8.60$ (calculado a partir de la ecuación (7)).

Los pKas calculados a partir de la ecuación de ajuste son comparables a los obtenidos por Benesch et al. (7) y se incluyen en la Tabla 4.

		EXPERIMENTAL					BIBLIOGRAFÍA (7)
		Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	SD	promedio	
cisteína etil éster	pK_A	7.62	7.50	7.39	0.12	7.50	7.45
	pK_B	7.03	6.92	6.86	0.09	6.94	6.77
	pK_C	8.39	8.35	8.29	0.05	8.34	8.41
	pK_D	9.09	9.05	8.93	0.08	9.02	9.09
L-cisteína	pK_A	8.27	8.31	8.28	0.02	8.29	8.53
	pK_B	9.35	8.95	8.97	0.23	9.09	8.86
	pK_C	10.77	10.42	10.44	0.20	10.54	10.36
	pK_D	9.69	9.68	9.64	0.03	9.67	10.03
L-cisteinil glicina	pK_A			7.93 ± 0.04			7.87
	pK_B			7.37 ± 0.05			7.14
	pK_C			8.60			8.75
	pK_D			9.26 ± 0.01			9.48

Tabla 4. Resultados de valores de pKa obtenidos experimentalmente para cisteína-etil éster, L-cisteína y L-cisteinil glicina en comparación con los de bibliografía.

Dada la ecuación de ajuste y los valores de pKa obtenidos es posible calcular la fracción de cada especie presente en la solución en el rango de pH considerado. Las figuras 10, 11 y 12 incluyen la distribución de especies para cada aminotiol en el rango de pH considerado.

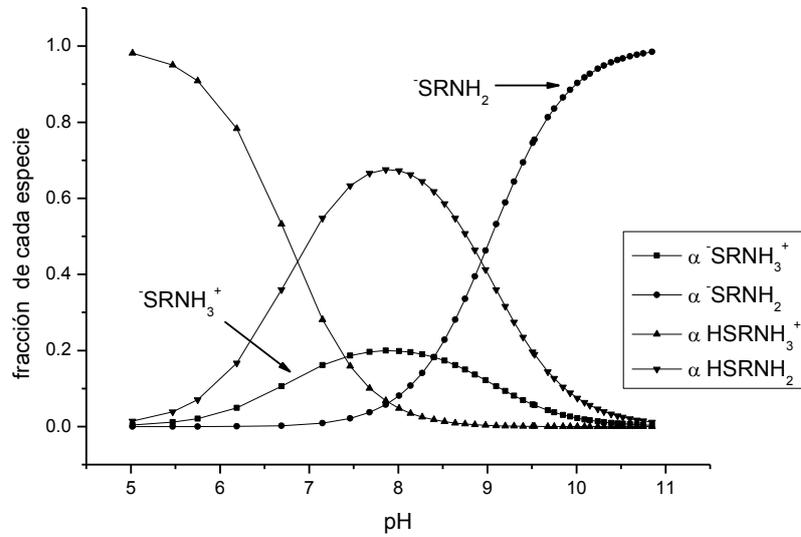


Figura 10. Distribución de especies de cisteína-etil éster en el rango de pH 5.00-11.00.

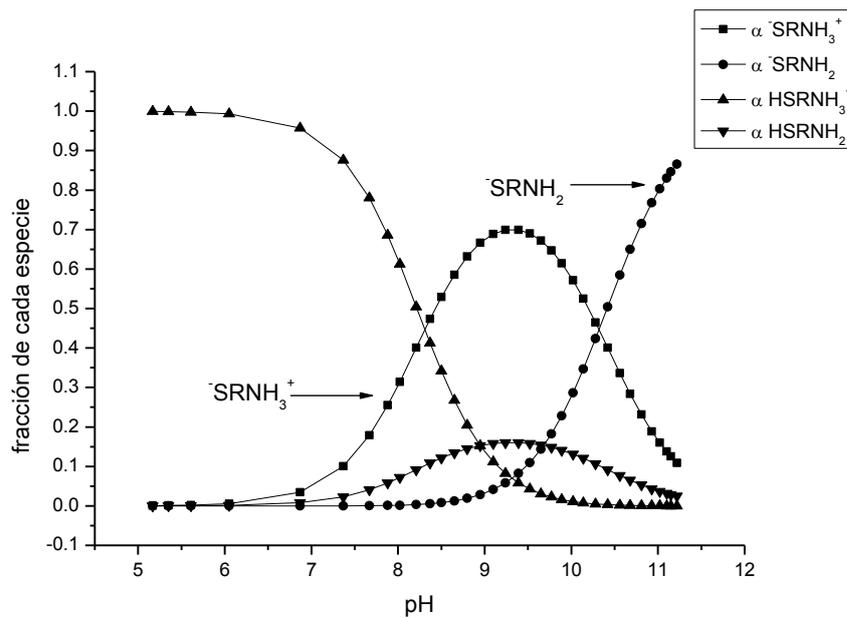


Figura 11. Distribución de especies de L-cisteína en el rango de pH de interés.

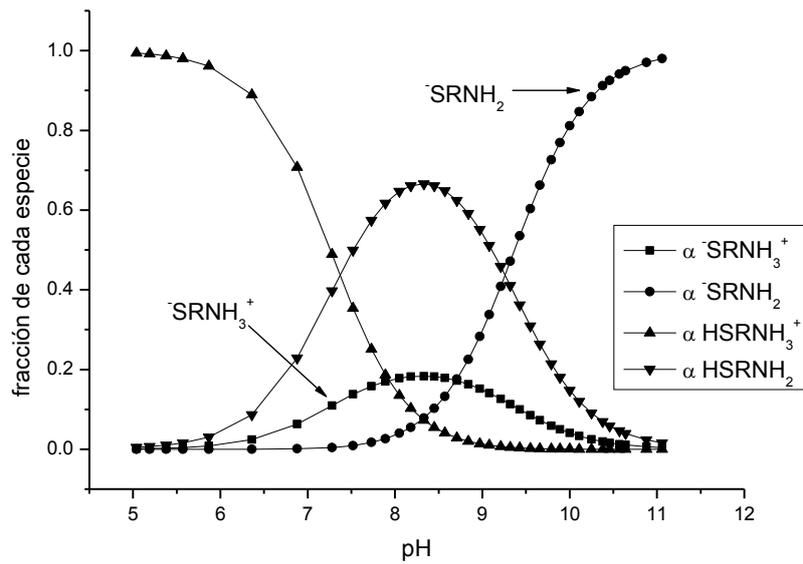
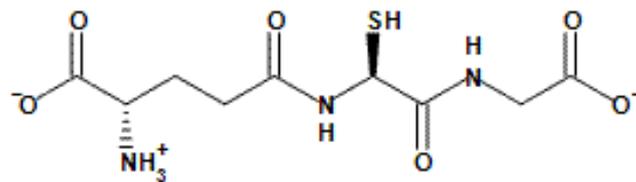


Figura 12. Distribución de especies de L-cisteinil-glicina en el rango de pH de interés.

glutación reducido (GSH)



Un ejemplo de ajuste de los datos obtenidos a la ecuación (10) se incluye en la Figura 13.

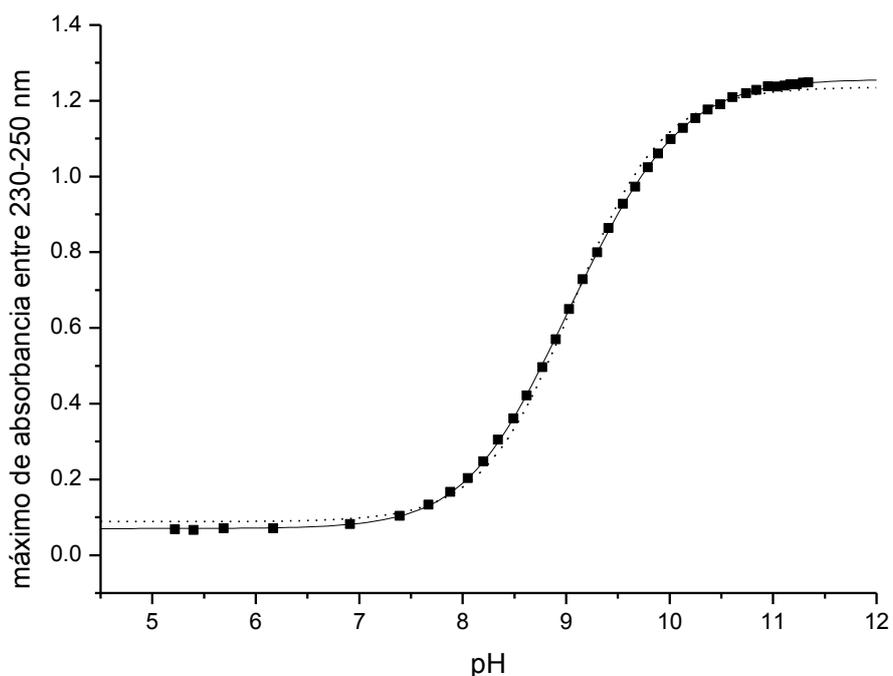


Figura 13. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de glutatión reducido 200 μM con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera y la de ajuste a la ecuación (11) se muestra en línea punteada. Los pKas obtenidos en el ajuste a la ecuación (10) fueron: $\text{pK}_A = 8.93 \pm 0.01$; $\text{pK}_B = 9.10 \pm 0.05$; $\text{pK}_D = 9.25 \pm 0.01$; $\text{pK}_C = 9.43$ (calculado a partir de la ecuación (7)). El pKa obtenido en el ajuste a la ecuación (11) fue: $\text{pK}_a = 9.06 \pm 0.01$.

Los datos forman una curva de titulación con la forma típica de un ácido monoprótico, y de hecho, Benesch et al. (7) informan un único valor de pKa para este aminotiol. Sin embargo, Rabenstein (10) informa 4 pKas para el rango de pH de interés.

Por lo anterior, se decidió realizar los dos tipos de ajuste y determinar qué ecuación se ajusta mejor a los datos. Los pKas calculados se incluyen en las Tablas 5 y 6.

	EXPERIMENTAL					BIBLIOGRAFÍA (7)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	SD	promedio	
pKa	9.06	9.08	0.08	0.01	9.07	9.20

Tabla 5. Valores de pKa obtenidos en el ajuste a la ecuación (11) para L-Glutatión reducido (GSH) en comparación con el de bibliografía.

	EXPERIMENTAL					BIBLIOGRAFÍA (10)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	SD	promedio	
pKA	8.93	8.95	8.94	0.01	8.94	8.93
pKB	9.10	9.15	9.14	0.03	9.13	9.13
pKC	9.43	9.48	9.49	0.03	9.46	9.28
pKD	9.25	9.27	9.28	0.02	9.27	9.08

Tabla 6. Valores de pKa obtenidos en el ajuste a la ecuación (10) para L-Glutatión reducido (GSH) en comparación con los de bibliografía.

Si bien ambos tipos de ajuste arrojan valores comparables a la bibliografía existente, el gráfico residual del ajuste a la ecuación (10) muestra menor dispersión y ausencia de tendencia en comparación con el gráfico residual del ajuste a la ecuación (11). El gráfico residual incluye la diferencia entre el dato experimental y la ecuación de ajuste en función de la variable independiente (pH). Dado lo anterior y a la existencia de dos grupos capaces de desprotonarse a valores de pH similares en el rango de pH de interés se considera el ajuste a 3 pKas como el más adecuado para este aminotiol. Los gráficos residuales de ambos ajustes se incluyen en la Figura 14.

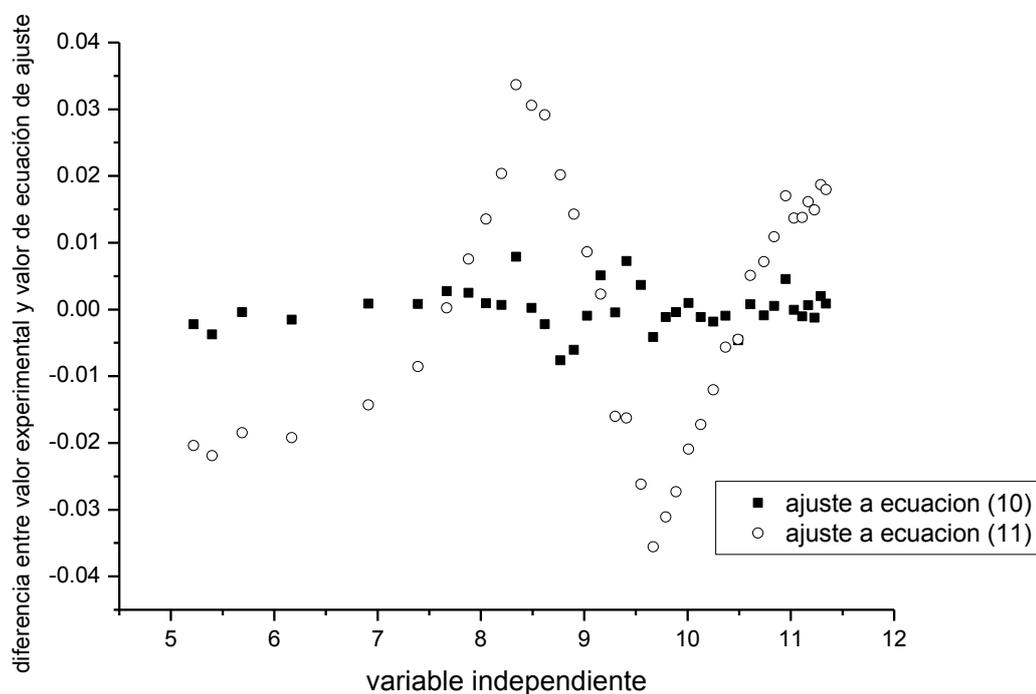


Figura 14. Gráficos residuales del ajuste a la ecuación (10) (■) y a la ecuación (11) (○), donde se observa que el rango de dispersión de los datos de ajuste a la ecuación (10) está aproximadamente entre -0.007 y 0.007 y no se observan tendencias, mientras que el rango de dispersión de los datos de ajuste a la ecuación (11) está aproximadamente entre -0.03 y 0.03 y se observa una tendencia.

En base a los valores de pKas obtenidos es posible calcular la fracción disociada de cada especie presente en la solución en el rango de pH considerado. La Figura 15 incluye la distribución de especies en el rango de pH considerado.

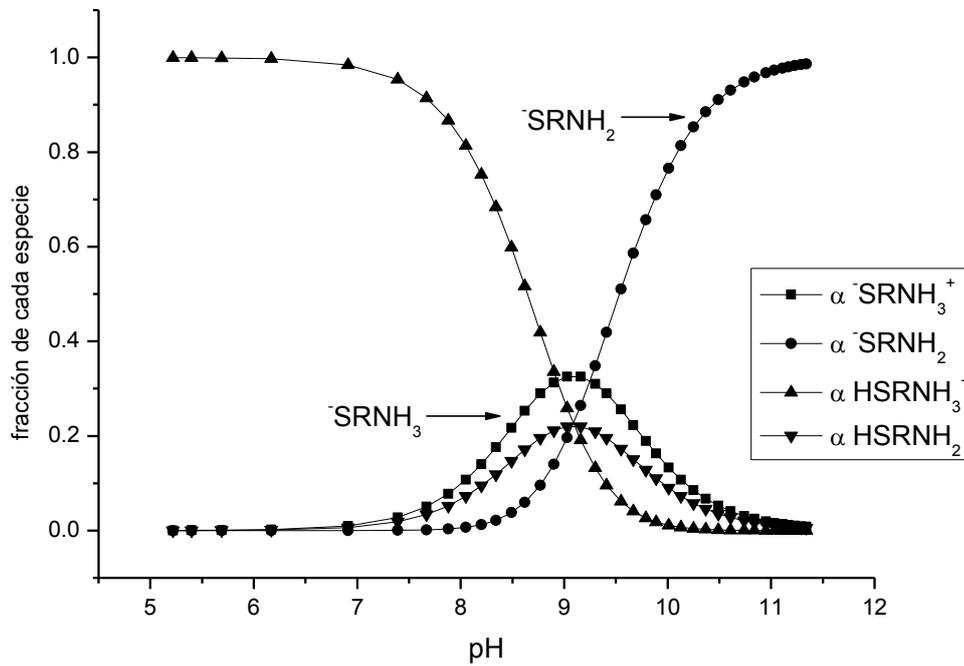
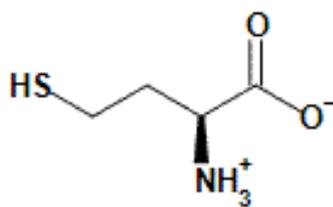


Figura 15. Distribución de especies de glutatión reducido (GSH) en el rango de pH de interés.

homocisteína



Un ejemplo de ajuste de los datos obtenidos a la ecuación de ajuste se incluye en la Figura 16.

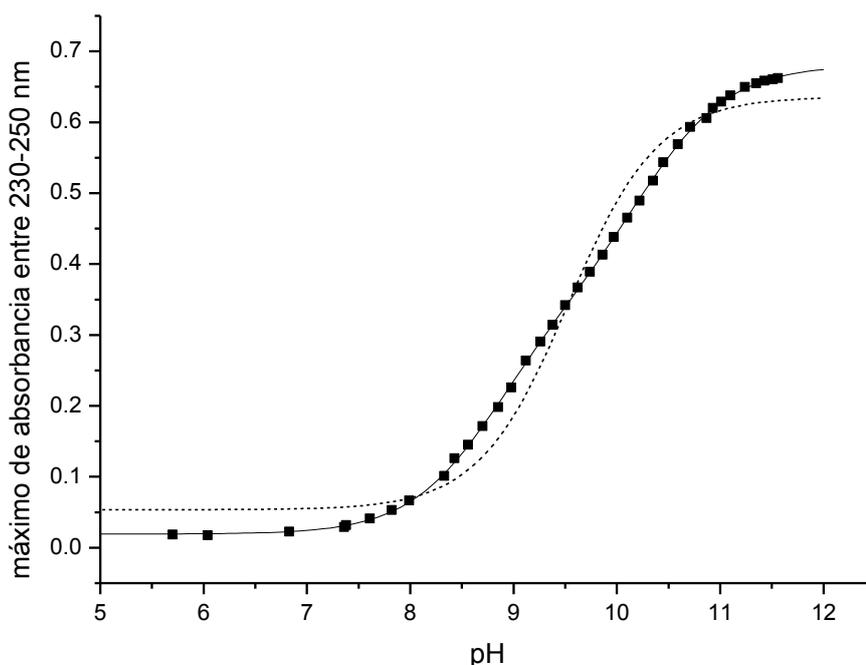


Figura 16. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de homocisteína 200 μM con NaOH 0,2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera y la de ajuste a la ecuación (11) se muestra en línea punteada. Los pKas obtenidos en el ajuste a la ecuación (10) fueron: $\text{pK}_A = 9.10 \pm 0.01$; $\text{pK}_B = 9.09 \pm 0.02$; $\text{pK}_D = 9.98 \pm 0.01$; $\text{pK}_C = 9.98$ (calculado a partir de la ecuación (7)). El pKa obtenido en el ajuste a la ecuación (11) fue: $\text{pK}_a = 9.53 \pm 0.05$.

Aún cuando tanto Benesch et al. (7) como Glushchenko et al. (11) informan un único valor de pKa para la homocisteína = 10.00, el ajuste a la ecuación (10) es significativamente mejor, tal como se observa en la Figura 16.

Dados los equilibrios ácido-base presentes en el rango de pH de interés, si $\text{pK}_A = \text{pK}_B$, entonces $\text{pK}_C = \text{pK}_D$, lo que se verifica en los resultados obtenidos en la Figura 16. Esta igualdad entre pK_C y pK_D , determina que las concentraciones relativas de las especies S^-RNH_2 y S^-RNH_3^+ sean muy similares en todo el intervalo de pH, ocultando la evidencia de dos grupos ácidos en el rango de pH de interés durante la titulación, lo que explica los resultados obtenidos por Benesch et al. y Glushchenko et al.

A partir de la ecuación de ajuste y los valores de pKas obtenidos es posible calcular la fracción disociada de cada especie presente en la solución en el rango de pH considerado. La Figura 17 incluye la distribución de especies en el rango de pH considerado.

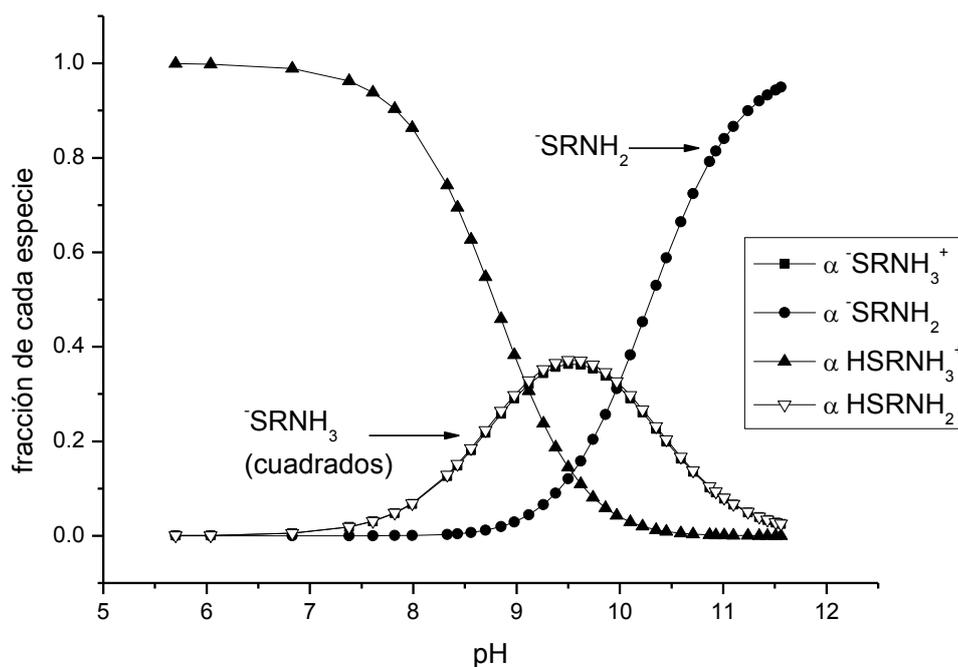


Figura 17. Distribución de especies de homocisteína en el rango de pH de interés.

La Figura 17 confirma la igualdad de concentraciones relativas discutida anteriormente.

cisteamina HCl



En las condiciones experimentales y a partir de valores de $\text{pH} \geq 9,50$, el aminotiol muestra una pérdida de absorbancia, lo que resulta en la imposibilidad de ajustar los datos a la ecuación (10). Un ejemplo de la autooxidación de este aminotiol se incluye en la Figura 18.

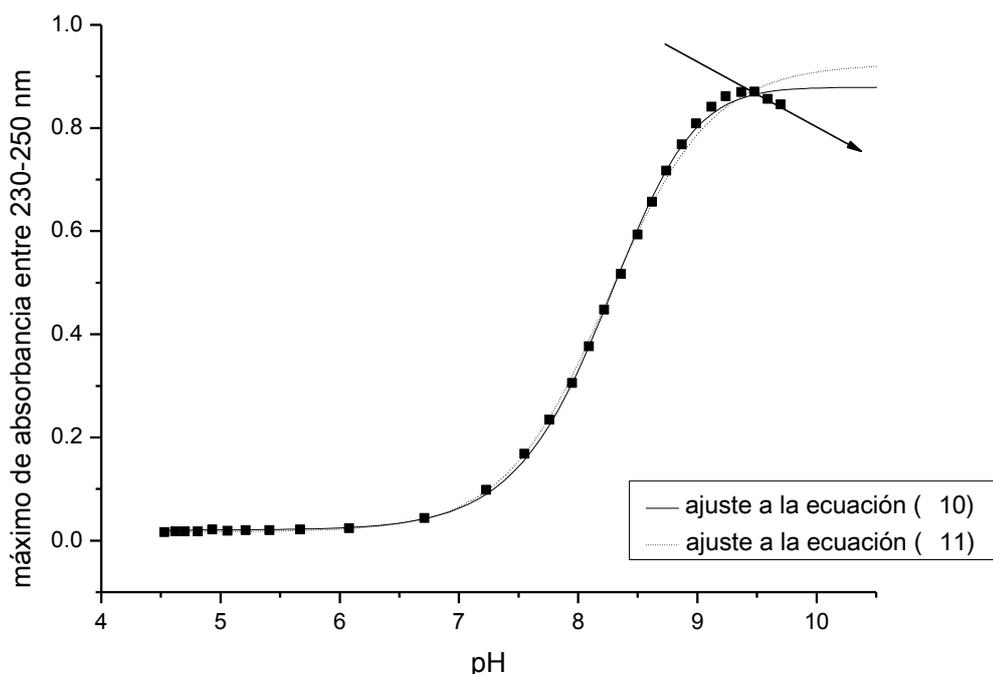


Figura 18. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de cisteamina 200 μM con NaOH 0,2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera y la de ajuste a la ecuación (11) se muestra en línea punteada. Los pKas obtenidos en el ajuste a la ecuación (10) fueron: $\text{pK}_A = 8.29 \pm 0.02$; $\text{pK}_B = 10.90 \pm 17.8$ y $\text{pK}_D = 6.40 \pm 17.3$. El pKa obtenido en el ajuste a la ecuación (11) fue: $\text{pK}_A = 8.25 \pm 0.02$. La flecha indica la pérdida de absorbancia que se repitió en todos los experimentos a valores de pH similares.

Dado que la forma de la curva que describen los datos en el rango de pH previo a la manifestación de la autoxidación se asemeja a la curva propia de un ácido monoprótico y que Benesch et al. ajustaron los datos de este aminotiol a una curva de ajuste a 1 pKa es que se decide realizar el ajuste a la ecuación (10) y a la ecuación (11).

El pKa obtenido a partir de la ecuación de ajuste (11) es comparable al de bibliografía y se incluye en la Tabla 7.

	EXPERIMENTAL					BIBLIOGRAFÍA (7)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	SD	promedio	
pKA	8.25	8.28	8.27	0.02	8.27	8.35

Tabla 7. Valores de pKa obtenidos experimentalmente para cisteamina HCl en comparación con el de bibliografía.

El ajuste a la ecuación (10) arrojó valores de pK_B y pK_D fuera del intervalo de pH estudiado, por lo que el modelo no sirve para ajustar estos datos.

Con el fin de ampliar el rango de pH previo a la pérdida de absorbancia y poder ajustar los datos a la ecuación (10) se decidió sacrificar parte de la resolución del experimento, aumentando el volumen de las alícuotas de NaOH 0.2 M adicionadas a 10 μL , a partir de pH 9.00. Este cambio en el método permitió alcanzar valores de pH de 9.90, aunque no fue suficiente para mejorar el ajuste. La curva de ajuste producto del cambio del método se incluye en la Figura 19.

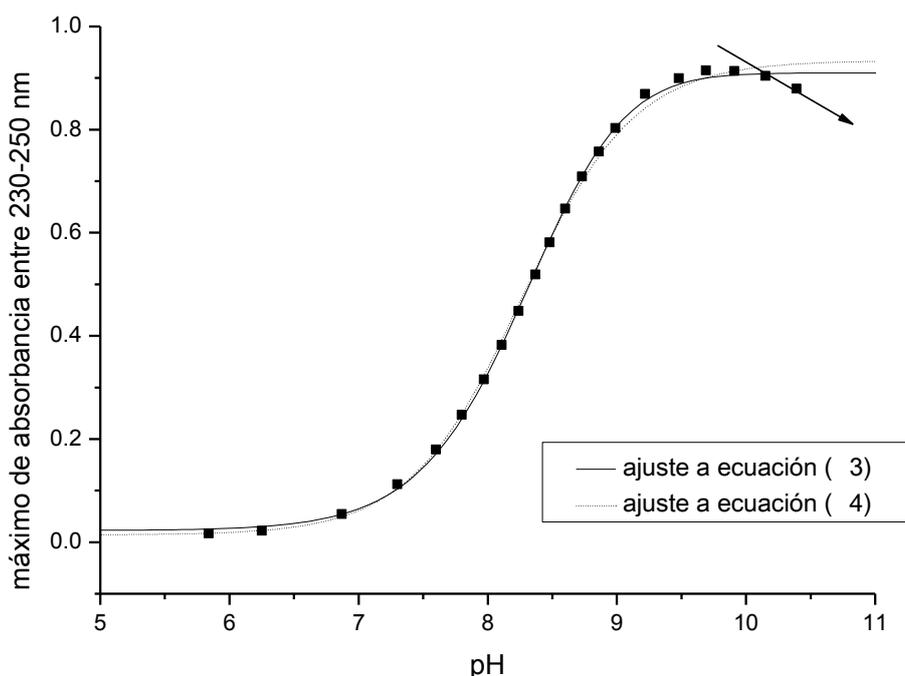


Figura 19. Ajuste de los datos obtenidos durante la titulación de cisteamina 200 μM con NaOH 0.2 M. Los datos obtenidos se muestran en puntos negros mientras que la curva de ajuste a la ecuación (10) se muestra en línea entera y la de ajuste a la ecuación (11) se muestra en línea punteada. Los pK_A s obtenidos en el ajuste a la ecuación (10) fueron: $pK_A = 8.31 \pm 0.03$; $pK_B = 11.1 \pm 30.0$ y $pK_D = 6.48 \pm 29.1$. El pK_A obtenido en el ajuste a la ecuación (11) fue: $pK_A = 8.27 \pm 0.02$. La flecha indica la pérdida de absorbancia que, en este caso, se observó a $\text{pH} = 9.90$.

El cambio de método tampoco permitió alcanzar valores de pH adecuados para ajustar a la ecuación (10).

Dada el sistema experimental planteado, se considera que la pérdida de absorbancia es causada por la autoxidación de la cisteamina en las condiciones del experimento.

Si bien la solución amortiguadora utilizada contiene DTPA como agente quelante de metales, una alternativa experimental que no se abordó consiste en adicionar un exceso de agente reductor justo antes de realizar la titulación, como por ejemplo, tributilfosfina. (12) Previo al uso, es crítico evaluar que este reactivo no interfiera con las lecturas de absorbancia en el rango de pH de interés.

IV. Determinación de las constantes de velocidad independientes de pH de algunos aminotioles para la reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr).

Dada la siguiente reacción de alquilación de tioles con monobromobimano (mBBr):



La constante de velocidad para esta reacción bimolecular está determinada por:

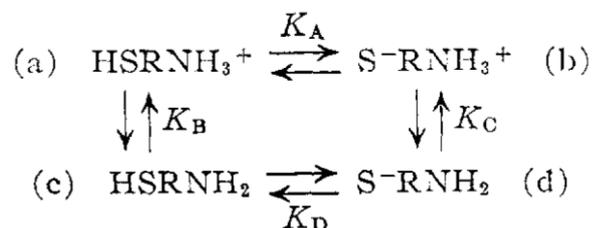
$$d[\text{RSR}']/dt = k_{\text{app}} [\text{RS}^-][\text{mBBr}] \quad (12)$$

Como la cinética de las reacciones que involucran tioles es dependiente de pH, por la diferencia de nucleofilicidad existente entre el tiolato y el tiol reducido, la constante de velocidad aparente depende de pH según la siguiente ecuación (2):

$$k_{\text{app}} = k [K_a^{\text{RSH}} / (K_a^{\text{RSH}} + [\text{H}^+])] \quad (13)$$

donde k es la constante de velocidad independiente de pH para la reacción.

La determinación de las constantes de velocidad independientes de pH para la reacción de alquilación con mBBr de cada uno de los aminotioles considerados anteriormente necesita, por ende, incluir las constantes microscópicas de ionización determinadas para cada especie tiolato en cada caso:



Por lo que para cada valor de pH se cumple:

$$k_{\text{app}} = k_b \text{(b)} + k_d \text{(d)} \quad (14)$$

Combinando las ecuaciones (14) y (10) queda:

$$k_{\text{app}} = k_b [(K_A / K_B) / ([\text{H}^+] / K_B + K_A / K_B + K_D / [\text{H}^+] + 1)] + k_d [(K_D / [\text{H}^+]) / ([\text{H}^+] / K_B + K_A / K_B + K_D / [\text{H}^+] + 1)] \quad (15)$$

A partir de los datos de k_{app} para la reacción de alquilación con mBBr de cisteína-etil-éster, cisteína y glutatión reducido (GSH) determinados por Sardi et al. (13) y las

constantes microscópicas de ionización determinadas en este trabajo, es que es posible determinar las constantes de velocidad independientes de pH. Los resultados se incluyen en las Figuras 20, 21 y 22.

cisteína-etil éster

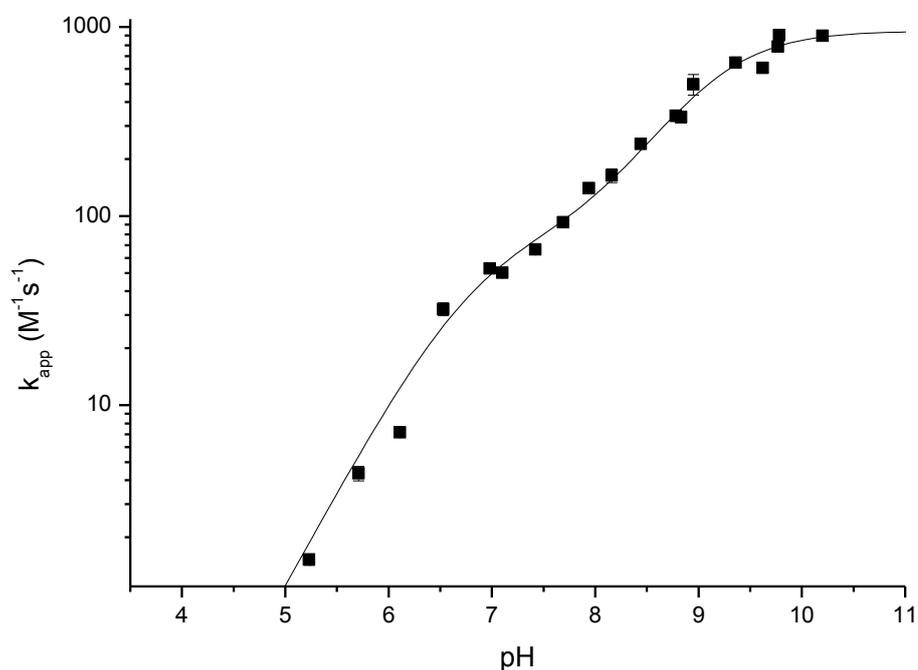


Figura 20. Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden con el pH para la reacción de cisteína-etil éster con mBBr. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos a la ecuación (15). Los valores obtenidos fueron: $k_b = (355 \pm 41) M^{-1}s^{-1}$; $k_d = (953 \pm 29) M^{-1}s^{-1}$; $pK_A = 7.50$; $pK_B = 6.94$; $pK_D = 9.02$.

L-cisteína:

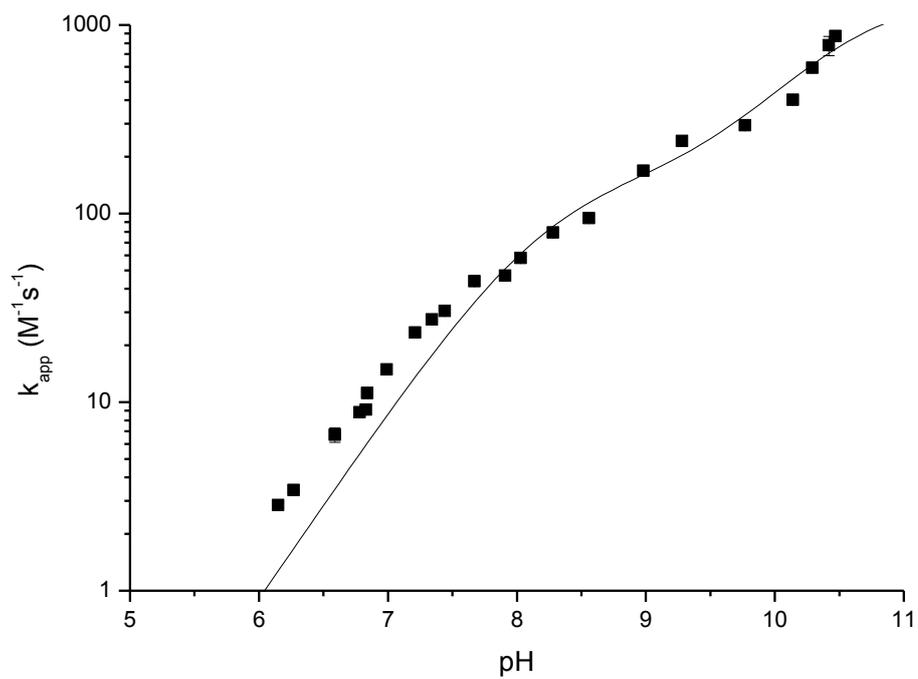


Figura 21. Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden con el pH para la reacción de cisteína con mBBR. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos a la ecuación (15). Los valores obtenidos fueron: $k_b = (148 \pm 29) M^{-1}s^{-1}$; $k_d = (1550 \pm 67) M^{-1}s^{-1}$; $pK_A = 8.29$; $pK_B = 9.09$; $pK_D = 9.67$.

glutión reducido (GSH)

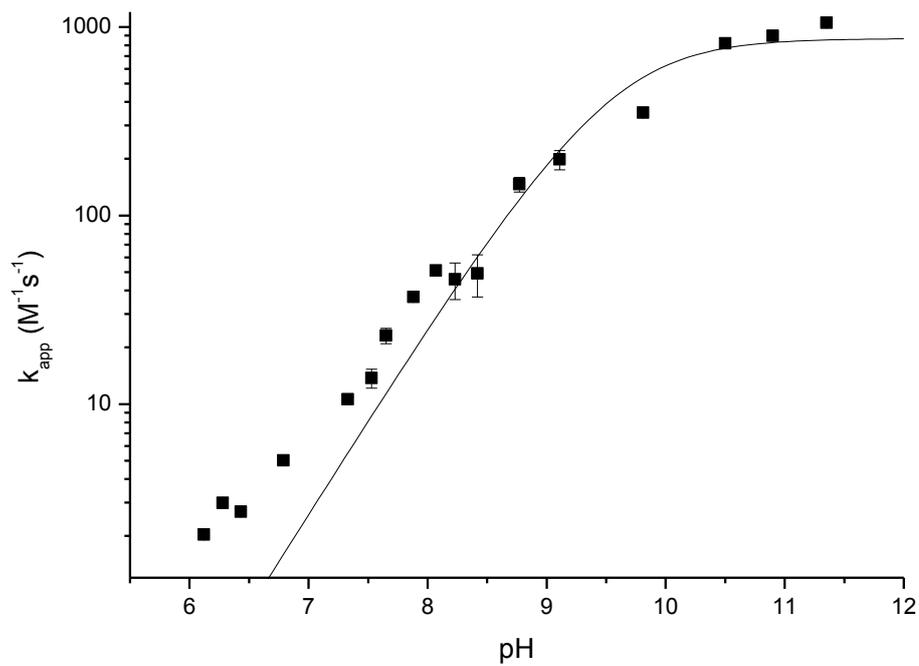


Figura 22. Dependencia de la constante de velocidad de segundo orden con el pH para la reacción de GSH con mBBr. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos a la ecuación (15). Los valores obtenidos fueron: $k_b = (226 \pm 65) M^{-1}s^{-1}$; $k_d = (868 \pm 61) M^{-1}s^{-1}$; $pK_A = 8.94$; $pK_B = 9.13$; $pK_D = 9.27$.

La comparación de los resultados obtenidos con los de bibliografía se incluye en la Tabla 8.

	EXPERIMENTAL		BIBLIOGRAFÍA (8)	
	pKa (experimental)	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	pKa	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
cisteína-etil-éster	7.50	355 ± 41	6.99	72.9
	9.02	953 ± 29	9.13	1070.5
L-cisteína	8.29	148 ± 29	7.98	124
	9.67	1550 ± 67	10.57	1494
L-glutación	8.94	226 ± 65	7.99	64.95
	9.27	868 ± 61	10.18	1126

Tabla 8. Resultados de valores de constante de velocidad independiente de pH de cisteína etil éster, L-cisteína y L-glutación para la reacción con mBBr a 37°C obtenidos a partir del ajuste de los datos a la ecuación (15) en comparación con los de bibliografía.

Si bien los valores obtenidos para L-cisteína son comparables con los de bibliografía, las diferencias en los valores observadas para cisteína-etil éster y para L-glutación son significativas.

Al analizar las distribuciones de especies obtenidas para cada uno de estos aminotioles (Figuras 10, 8 y 15, respectivamente) en el rango de pH entre pK_A y pK_D, es posible observar que en el caso de L-cisteína la especie S⁻RNH₃⁺ contribuye hasta en un 70% a la mezcla de especies, mientras que para cisteína-etil éster esta especie contribuye hasta un 20% en la mezcla y para GSH hasta un 50%.

La contribución mayoritaria de S⁻RNH₃⁺ en el caso de L-cisteína determina que la constante de disociación macroscópica hallada por Sardi sea similar a la constante de disociación microscópica hallada para esa especie (K_A). Lo inverso se verifica tanto para cisteína-etil éster como para GSH.

V. Determinación de la relación de Brønsted de algunos aminotioles para la reacción de alquilación con monobromobimano (mBBr).

Considerando los resultados para tioles de bajo peso molecular utilizados por Sardi en su tesina (8) y utilizando los valores de pKa y k_{RS} obtenidos experimentalmente en este trabajo para cisteína-etil éster, L-cisteína y GSH, se construye una correlación de Brønsted con el fin de estudiar la relación entre basicidad y nucleofilia de estos compuestos.

Los datos considerados se incluyen en la Tabla 9 y su correlación se incluye en la Figura 23.

	pKa	k_{RS} ($M^{-1}s^{-1}$)
CysEE	7.50 ± 0.12	355 ± 41
Cys	8.29 ± 0.02	148 ± 29
N-acetil-Cys	8.87 ± 0.08	1288 ± 72
GSH	8.94 ± 0.01	226 ± 65
CysEE	9.02 ± 0.08	953 ± 29
GSH	9.27 ± 0.02	868 ± 61
Cys	9.67 ± 0.03	1550 ± 67
2-ME	9.67 ± 0.10	1025 ± 45
captopril	9.70 ± 0.10	1642 ± 173
DMSA	10.15 ± 0.08	3159 ± 198
2-mercaptoacético	10.80 ± 0.16	4060 ± 542

Tabla 9. Datos considerados para la determinación del coeficiente de Brønsted.

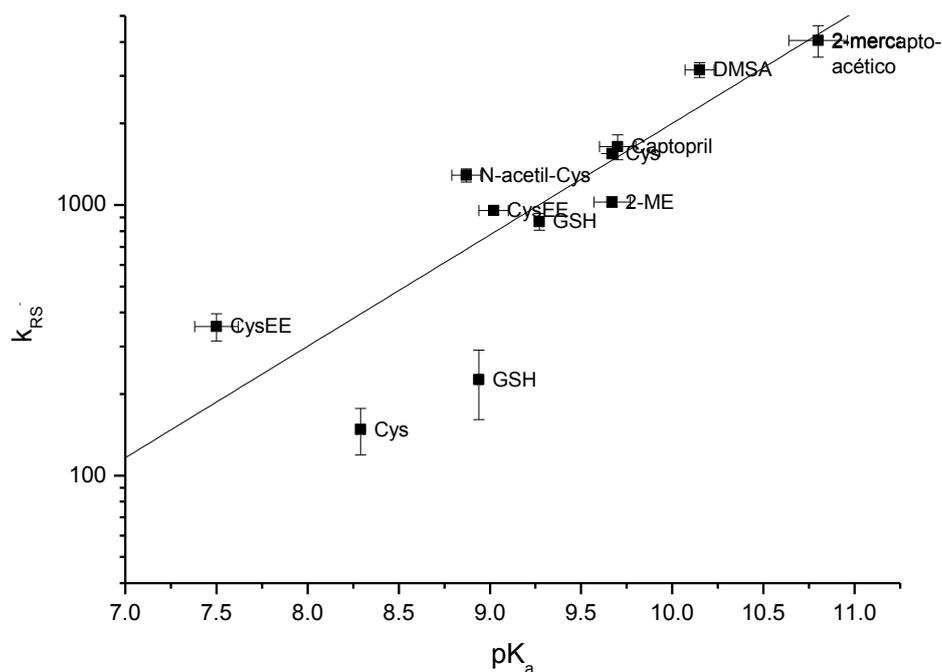


Figura 23. Gráfico de correlación de Brønsted para distintos tioles de bajo peso molecular con la reacción de alquilación con mBBr a 37°C. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos a la ecuación (5), donde $\beta_{\text{Nuc}} = 0.41 \pm 0.07$; $C = -0.82 \pm 0.66$ y $R^2 = 0.79384$.

Si bien los valores de β_{Nuc} y C determinados son comparables a los obtenidos por Sardi, es importante notar que el ajuste lineal de los datos es pobre, en particular para los tres aminotioles ensayados.

A partir de este trabajo, los valores de las constantes microscópicas de disociación de las especies de interés son conocidos, por lo que es posible focalizarse en obtener mayor cantidad de datos cinéticos en el entorno de los mismos. Esto permitirá mejorar significativamente el ajuste de los datos cinéticos a las constantes de velocidad independientes de pH, y por ende, mejorar el ajuste de la correlación de Brønsted.

8. CONCLUSIONES:

Si bien la correlación de Brønsted obtenida no satisfizo la linealidad esperada, se identificaron oportunidades de mejora para que este estudio pueda ser abordado en el futuro con mejores resultados.

La determinación de las constantes de disociación microscópicas verificó la variabilidad en la acidez del grupo tiol y del grupo amino, ionizándose primero uno u otro según el compuesto ensayado.

El método utilizado permitió determinar constantes de disociación microscópicas en concordancia con los datos de bibliografía, e incluso explicar las discordancias entre valores informados por distintos investigadores, como en el caso de GSH y homocisteína.

El estudio de la distribución de especies presentes en la mezcla de un aminotiol determinado en el rango de pH de interés permitió conocer el contenido fraccional de cada especie tiolato a un valor de pH determinado, lo que mejorará la descripción de reacciones cinéticas que involucren al grupo tiolato.

9. REFERENCIAS:

1. Kettenhofen, N. J., and Wood, M. J. (2010) Formation, Reactivity, and Detection of Protein Sulfenic Acids, *Chemical Research in Toxicology* 23, 1633-1646.
2. Nagy, P. (2013) Kinetics and Mechanisms of Thiol-Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways, *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 1623-1641.
3. Harris, J. M., and McManus, S. P. (1987) *Nucleophilicity*, American Chemistry Society.
4. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction, *Chemical Research in Toxicology* 24, 434-450.
5. Jocelyn, P. C. (1972) *Biochemistry of the SH Group*, 1st Edition ed., Academic Press Inc.
6. Nagy, P., and Winterbourn, C. C. (2010) Redox Chemistry of Biological Thiols, In *Advances in Molecular Toxicology* (Fishbein, J. C., Ed.), Elsevier B.V.
7. Benesch, R. E., and Benesch, R. (1955) The Acid Strength of the -SH Group in Cysteine and Related Compounds, *Journal of the American Chemical Society* 77, 5877-5881.
8. Sardi, F. (2011) Caracterización de la acidez y nucleofilia de tioles de bajo peso molecular y tioles proteicos, In *Laboratorio de Físicoquímica Biológica-Enzimología*, p 76, Universidad de la República, Montevideo.
9. Ellis, K. J., and Morrison, J. F. (1982) Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-Dependent Processes, *Methods in Enzymology* 87, 405-426.
10. Rabenstein, D. L. (1973) Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Acid-Base Chemistry of Amino Acids and Peptides. 1. Microscopic Ionization Constants of Glutathione and Methylmercury-Complexed Glutathione., *Journal of the American Chemical Society* 95, 2797-2803.
11. Glushchenko, A. V., and Jacobsen, D. W. (2007) Molecular Targeting of Proteins by L-Homocysteine: Mechanistic Implications for Vascular Disease, *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 1883-1898.
12. Kirkpatrick, A., and Maclaren, J. A. (1973) Thiol Solutions-Inhibition of Autoxidation, *Analytical Biochemistry* 56, 137-139.

13. Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M. A., and Ferrer-Sueta, G. (2013) Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection, *Analytical Biochemistry* 435, 74-82.