

Laboratorio QFII

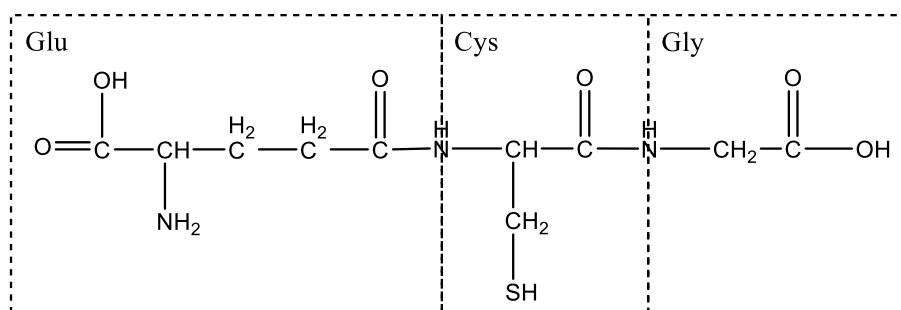
Reacciones Consecutivas. Cinética de Oxidación de Glutación por Cr(VI)

OBJETIVOS

Estudiar la cinética de reacciones consecutivas a través de la reducción de Cr(VI) por glutación. Obtener, a partir del ajuste biexponencial del decaimiento de la concentración de Cr(VI) en función del tiempo, las constantes de velocidad asociadas a cada paso del mecanismo de reacción.

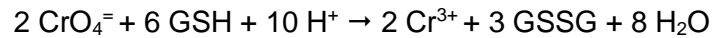
INTRODUCCIÓN

El glutación, cuya estructura química se muestra en el Esquema 1, es un tripéptido formado por cisteína, ácido glutámico y glicina. Se produce en forma natural en las células animales y puede incorporarse a través de alimentos tales como frutas, vegetales frescos, pescados y carnes. Una de sus funciones es la de antioxidante, contribuyendo a la eliminación de radicales libres en el organismo. Su carácter reductor proviene de la conversión de la cisteína en cistina mediante la unión de dos moléculas de glutación con formación de puente disulfuro.

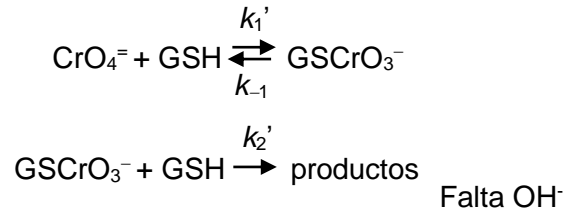


Esquema 1: Estructura química del glutación

En la práctica se llevará a cabo el estudio de la cinética de oxidación del glutatión por Cr(VI). La estequiometría de la reacción es:

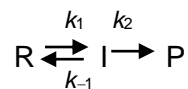


donde GSH y GSSG representan al glutatión y su producto de oxidación respectivamente. La reacción ocurre según el mecanismo simplificado:



donde GSCrO₃⁻ es un compuesto intermediario de Cr(V).

En exceso de glutatión los procesos 1' y 2' son de pseudo orden 1. Definiendo $k_1 = k_1' [\text{GSH}]$ y $k_2 = k_2' [\text{GSH}]$, el mecanismo puede reducirse a:



donde el reactivo R es el ion cromato, I el intermediario y P los productos de reacción.

El cambio de la concentración de las tres especies en función del tiempo está dado por las siguientes ecuaciones cinéticas^{1,2}:

$$\frac{d[\text{R}]}{dt} = -k_1[\text{R}] + k_{-1}[\text{I}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{I}]}{dt} = k_1[\text{R}] - (k_{-1} + k_2)[\text{I}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{I}] \quad (3)$$

La resolución de las ecuaciones (1) a (3) conduce a las siguientes expresiones para la concentración de cada especie en función del tiempo³:

$$[\text{R}](t) = \frac{[\text{R}]_0}{A + 1} \left(e^{-\lambda_1 t} + A e^{-\lambda_2 t} \right) \quad (4)$$

$$[\text{I}](t) = \frac{[\text{R}]_0 k_1}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \left(e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t} \right) \quad (5)$$

$$[P](t) = [R]_0 - [R](t) - [I](t) \quad (6)$$

donde:

$$\lambda_1 = \frac{p - q}{2}, \quad \lambda_2 = \frac{p + q}{2}, \quad A = \frac{k_1 - \lambda_1}{\lambda_2 - k_1} \quad (7)$$

$$p = k_1 + k_{-1} + k_2, \quad q = \sqrt{p^2 - 4k_1k_2} \quad (8)$$

Un ajuste por cuadrados mínimos no lineal de los valores experimentales de la concentración de R en función del tiempo de acuerdo con la ecuación biexponencial (4) permitirá obtener los parámetros A, λ_1 y λ_2 . Mediante las siguientes ecuaciones podrán obtenerse los valores de las tres constantes de velocidad unimoleculares buscadas:

$$k_1 = \frac{A\lambda_2 + \lambda_1}{A + 1}, \quad k_{-1} = \lambda_1 + \lambda_2 - k_1 - k_2, \quad k_2 = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{k_1} \quad (9)$$

PARTE EXPERIMENTAL

Se preparan en un matraz 25 mL de solución acuosa de glutatión $8,0 \cdot 10^{-3}$ M. Se toman 10 mL de dicha solución y se introducen en un vaso de precipitados, conjuntamente con 2 mL de Na_2HPO_4 0,4 M, y 3 mL de HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M. Se ajusta la solución a pH 6 con la ayuda de un pHmetro mediante pequeños agregados de HCl o NaOH. Luego se colocan 3 mL de la misma en una cubeta de absorción de 1 cm de paso óptico y se registra el blanco. Se agregan 0,2 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $1,6 \cdot 10^{-3}$ M (notar que, si bien se parte de dicromato de potasio, al pH de trabajo su forma mayoritaria es el ión cromato), se agita y se comienza a registrar simultáneamente la absorbancia del Cr(VI) a 370 nm y la del intermediario a 430 nm en un espectrómetro de matriz de diodos. Se debe registrar la absorbancia a 680 nm, 690 nm y 700 nm de modo de corregir posteriormente la línea de base. El registro se hace a partir del momento en que se agrega el dicromato. La medida de absorbancia se realiza por un tiempo de alrededor de 40 minutos a intervalos de 20 segundos.

A partir de una solución igual a la anterior a pH 6 que no contiene glutatión (pero sí dicromato de potasio) se obtiene el espectro de absorción entre 300 y 700 nm, que será utilizado para elegir los valores semilla en el ajuste no lineal (a continuación).

TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los valores registrados a 370 nm en función del tiempo se ajustan mediante la ecuación (4) expresada en términos de absorbancia usando un método de cuadrados mínimos no lineal a fin de obtener λ_1 , λ_2 y $A^{4,5}$. Para ello, se realiza inicialmente un *stripping*

exponencial de modo de obtener los valores semilla (*seed*) a introducir en el ajuste no lineal¹.

Una vez hecho el ajuste no lineal se calculan las constantes de velocidad k_1 , k_{-1} y k_2 . Observar que, aunque el coeficiente de absorción molar del Cr(VI) es conocido, éste y el del intermediario no son necesarios para el cálculo de las constantes cinéticas.

A partir de los valores λ_1 , λ_2 y A hallados es posible reconstruir la variación de concentración del intermediario en función del tiempo mediante la ecuación (5) y compararla con los valores de absorbancia experimentales obtenidos a 430 nm. A partir de este ajuste calcular el coeficiente de absorción del intermediario a 430 nm.

GUÍA PARA REALIZAR EL INFORME

1. *Objetivo*: Discuta en forma breve el objetivo de la práctica haciendo énfasis en los conocimientos aprendidos.
2. *Parte experimental*: Comente el trabajo experimental realizado, sin repetir lo que está indicado en la guía. Describa los cálculos realizados.
3. *Resultados*: Informe en tablas y gráficos los resultados obtenidos teniendo en cuenta el error en las mediciones realizadas.
4. *Conclusiones y discusión*: Discuta los resultados obtenidos y compárelos con los publicados en la literatura. Analice los errores cometidos y discuta las posibles diferencias.

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

1. Discuta cómo se obtienen los valores iniciales para A , λ_1 y λ_2 por el método de cuadrados mínimos no lineal.
2. Discuta las correcciones que deben realizarse a la absorbancia a 430 nm para determinar la evolución de la concentración del intermediario en función del tiempo.
3. Analice las aproximaciones posibles en la determinación de la concentración de R en función del tiempo en las siguientes condiciones: i) $(k_1+k_{-1}) \gg k_2$; ii) $(k_{-1}+k_2) \gg k_1$.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. R. Ramachandran and A. M. Halpern, A novel Experiment in Chemical Kinetics: The $A=B \rightarrow C$ Reaction system, *J. Chem. Ed.*, 74, 1997, 975.
2. J. F. Perez-Benito, D. Lamrhari and C. Arias, Three Rate constants from a single Kinetic Experiment: Formation, Decomposition, and Reactivity of the Cr(VI)-Glutathione Thioester Intermediate, *J. Phys. Chem.*, 98, 1994, 12621.
3. G. I. Gellene, Application of Kinetic Approximation to the $A=B \rightarrow C$ Reaction System, *J. Chem. Educ.*, 72, 1995, 196.

4. T. J. Zielinsky, R. D. Allendoerfer, Least Squares Fitting of Nonlinear Data in the Undergraduate Laboratory, *J. Chem. Educ.*, 74, 1997, 1001.

5. P. R. Bevington, D. K. Robinson in *Data Reduction and Error Analysis in the Physical Sciences*, McGraw Hill Ed., N.Y. 1992.