



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudio del mecanismo da acción de aminoácidos conteniendo selenio como antioxidantes

Estudo do mecanismo de acción de aminoácidos contendo selenio como antioxidante

Study of the mechanism of action of selenium-containing amino acids as antioxidants

Sergio Seijo Pensado

Curso: 2020 - 2021.

Convocatoria: Julio

Director 1: María Isabel Fernández Pérez

Director 2: Moisés Canle López

Acrónimos

Cys : Cisteína

GPx : Glutatiónpoxidasa.

ClO⁻: Hipoclorito

H₂O₂ : Peróxido de hidrógeno

HClO: Equilibrio ácido-base hipoclorito/acido hipocloroso o ácido hipocloroso.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

Met : Metionina

Se: Selenio

SeClMet: Selenoclorometionina

Sec : Selenocisteína

SeMet : Selenometionina

SeOMet: Selenoximetionina

SeO₂Met: Selenodioximetionina

t_R: Tiempo de retención

UV/vis : Ultravioleta/visible.

INDICE

Acrónimos	2
1. Resumen	5
Resumo	6
Summary	7
2. Objetivo.....	9
Cronograma.....	9
3. Introducción	10
3.1 Selenio.....	10
3.2 Selenio Orgánico	12
3.2.1 Selenoaminoácidos	13
3.2.1.1 Selenometionina.....	14
3.2.1.2 Seleniocisteína	15
3.3 Importancia biológica de los selenoaminoácidos.....	16
3.3.1 Funciones de los selenoaminoácidos.....	16
3.3.2 Beneficios del selenio en la salud.	17
3.3.3 Deficiencia de selenio	17
3.3.4 Toxicidad del Selenio	19
4. Antecedentes bibliográficos.	19
4.1 Función antioxidante de los selenoaminoácidos	19
4.2 Radicales libres	19
4.3 Estrés oxidativo	20
4.4 Sistemas de defensa Antioxidante.....	20
4.5 Selenio como sistema de defensa antioxidante	21
4.6 Capacidad antioxidante del Selenoaminoácidos.	24
5. Procedimiento experimental.....	24
5.1 Reactivos y preparación de disoluciones	24

5.1.1 Oxidantes: HClO.....	24
5.1.2 Disolución de SeMet.....	25
5.1.3 Otras disoluciones	26
5.2 Equipo instrumental	26
5.2.1 Espectrofotómetros.....	26
5.2.2 Medidas de pH	27
5.2.3 HPLC-Cromatografía líquida de alta eficacia	27
5.3 Mezcla de reacción	27
5.4 Estudios espectrofotométricos	29
5.6 Estudio cromatográfico	35
6. Tratamiento de datos	38
6.1 Método cinético.....	38
6.1.1 Fundamento teórico.....	38
6.1.2 Tratamiento de datos cinéticos.....	41
7. Resultados y discusión	42
8. Conclusiones.	50
Conclusións	50
Conclusions	50
9. Bibliografía.....	52

1. Resumen

Desde el punto de vista bioquímico el selenio forma parte esencial del metabolismo a través de las denominadas selenoproteínas. Estas moléculas presentan una gran importancia en el sistema inmunológico, como defensa antioxidante y en el mantenimiento del estado redox celular.

En una sociedad cada vez más concienciada en el cuidado personal, la adquisición de conductas saludables y la preocupación por evitar enfermedades, existen todavía graves problemas que afectan a muchos individuos de nuestra sociedad.

Uno de estos problemas es el daño oxidativo o también denominado estrés oxidativo. En los últimos años se han acumulado datos que nos permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian, permiten mantener un equilibrio homeostático en los organismos y participan también en diversos procesos fisiológicos, como, por ejemplo, en la defensa ante agentes infecciosos.

Sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas y son capaces de dañar a biomoléculas presentes en las células. Una alta concentración de radicales libres en un organismo ocasiona un fenómeno conocido como estrés oxidativo el cual, está asociado a diversas enfermedades. Este incremento de radicales libres puede verse reflejado por la presencia de contaminantes ambientales, del consumo de ciertos alimentos y de sustancias nocivas para el organismo.

Los aminoácidos de selenio son una de las respuestas antioxidantes que los organismos presentan para la eliminación de radicales libres y para combatir el estrés oxidativo. Los selenoaminoácidos actúan en la defensa antioxidante a través principalmente de los de la selenometionina y la selenocisteína.

Estudios previos han determinado que las reacciones de aminoácidos derivados de selenio con agentes oxidantes son excepcionalmente rápidas en comparación con aminoácidos análogos de azufre. Por lo cual se pretende aportar datos que verifiquen estos estudios.

En este trabajo de fin de grado se pretenden determinar cómo estos selenoaminoácidos actúan en las reacciones con agentes oxidantes, aportando

información de los mecanismos de estas y de sus propiedades cinéticas, analizando también factores que puedan afectar a estas dos características.

Palabras clave: aminoácido, antioxidante, catión haloselenonio, cloración, estrés oxidativo, oxidación, agentes oxidantes, selenio selenometionina

Resumo

Dende o punto de vista bioquímico o selenio forma unha parte esencial do metabolismo a través das chamadas selenoproteínas. Estas moléculas teñen unha grande importancia no sistema inmunolóxico, como sistema antioxidante e no mantemento do estado redox celular.

Nunha sociedade cada vez máis conscente do coidado persoal, a adquisición de conductas saudables e a preocupación por evitar enfermidades, aínda existen graves problemas que afectan a moitos individuos da nosa sociedade.

Un destes problemas é o dano oxidativo ou tamén chamado estrés oxidativo. Nos derradeiros anos acumúlanse datos que permiten afirmar que os radicais libres e o conxunto das especies reactivas asociadas a eles, permiten manter o equilibrio homeostático nos organismos e tamén participar nos diversos procesos fisiolóxicos, como, por exemplo, a defensa contra axentes infecciosos.

Non obstante, estas moléculas son moi reactivas e son capaces de danar as biomoléculas presentes nas células. Unha alta concentración de radicais libres nun organismo provoca un fenómeno coñecido como estrés oxidativo, asociado a varias enfermidades. O aumento dos radicais libres poden reflectirse pola presenza de contaminantes ambientais, o consumo de certos alimentos e substancias nocivas para o organismo.

Os aminoácidos de selenio son unha das respostas antioxidantes que presentan os organismos para a eliminación de radicais libres e para combater o estrés oxidativo. Os selenoaminoácidos actúan na defensa antioxidante principalmente a través da selenometionina e a selenocisteína.

Estudos previos determinaron que as reaccións dos aminoácidos derivados do selenio con axentes oxidantes son excepcionalmente rápidas en comparación cos

aminoácidos análogos de xofre. Polo tanto, preténdese proporcionar datos para verificar estes estudos.

Neste traballo de fin de grao, o obxectivo é determinar cómo actúan estes selenoaminoácidos en reaccións con axentes oxidantes, proporcionando información sobre os seus mecanismo e as súas propiedades cinéticas, analizando tamén os factores que poden afectar a estas dúas características.

Palabras clave: aminoácido, antioxidante, catión haloselenonio, cloración, estrés oxidativo, oxidación, axentes oxidantes, selenio selenometionina

Summary

From a biochemical view, selenium forms an essential part of the metabolism through the so-called selenoproteins. These molecules have a great importance in the immune system, as an antioxidant defence and in the maintenance of the cellular redox state.

In a society that is becoming increasingly aware of personal care, the acquisition of healthy behaviours and the concern to avoid illnesses, there are still serious problems that affect many individuals in our society.

One of these problems is oxidative damage or oxidative stress. In recent years, the data recopilation allow us to affirm that free radicals and the set of reactive species associated with them allow us to maintain a homeostatic balance in organisms and also participate in various physiological processes, such as, for example, in the defence against infectious agents.

However, these molecules are highly reactive and are capable of damaging biomolecules present in cells. A high concentration of free radicals in an organism causes a phenomenon known as oxidative stress, which is associated with various diseases. This increase in free radicals can be reflected in the presence of environmental pollutants, the consumption of certain foods and substances harmful to the body.

Selenium amino acids are one of the antioxidant responses of organisms to delete free radicals and fight oxidative stress. Selenoamino acids act in the antioxidant defence mainly through the various selenoamino acids.

Previous studies have determined that the reactions of selenium-derived amino acids with oxidising agents are exceptionally fast compared to sulphur analogue amino acids. It is therefore intended to provide data to verify these studies.

In this thesis, the aim is to determine how these selenoamino acids act in reactions with oxidising agents, providing information on the mechanisms of these reactions and their kinetic properties, as well as analysing factors that may affect these two characteristics.

Keywords: amino acid, antioxidant, haloselenonium cation, chloration, oxidative stress, oxidation, oxidizers agents, selenium, selenomethionine

2. Objetivo

Este trabajo tiene como objetivo de estudio, la capacidad antioxidante de los aminoácidos que contienen selenio y el mecanismo de acción de estos compuestos. Se analiza la capacidad de estos compuestos de mantener el equilibrio de oxidación-reducción, actuando como agentes antioxidantes, reduciendo los radicales libres que se producen en el metabolismo.

Para demostrar esto, se realiza un estudio cinético y espectrofotométrico de la reacción entre la selenometionina y un agente oxidante, el hipoclorito (HClO).

Los datos obtenidos en este estudio se emplean también para analizar los productos de las reacciones de selenoaminoácidos, así como, la propuesta de mecanismos de reacción.

Se pretende determinar las constantes de velocidad de los aminoácidos que contienen selenio y compararlas con aminoácidos de azufre para evaluar sus posibles beneficios en diferentes áreas científicas.

Cronograma

	Marzo 21	Abril 21	Mayo 21	Junio 21	Julio 21
Revisión bibliográfica					
Trabajo experimental					
Análisis de Resultados					
Análisis crítico de la bibliografía					
Redacción de la memoria					

3. Introducción

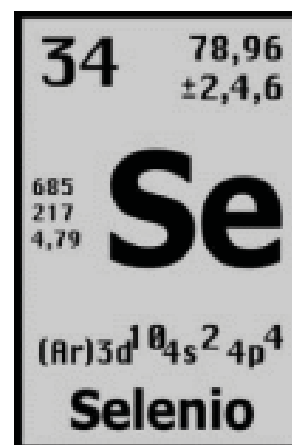
3.1 Selenio

Este elemento fue descubierto de forma accidental por el químico sueco J.J Berzelius en 1817, también se le atribuye el descubrimiento de los elementos silicio, cerio y torio. El nombre de Selenio viene dado por la personificación griega de la luna Selene debido a su gran analogía con el elemento telurio (Tellus = tierra). ^[1]

El selenio pertenece al grupo 16 del sistema periódico, denominado calcógenos (formadores de minerales), ubicado entre el azufre y el telurio, con los que guarda similitudes, pero también diferencias responsables en parte de su papel biológico diferencial. En estado natural el selenio se presenta en estado sólido de aspecto gris metálico. A continuación, podemos observar las características principales del selenio recogidas en la siguiente tabla:

Símbolo químico	Se
Número atómico	34
Grupo	16
Periodo	4
Aspecto	Gris metálico
Bloque	p
Densidad	4.79 g/ml
Masa atómica	78.96
Radio covalente	1.16 Å
Radio iónica	1.98 Å
Radio atómico	1.40 Å
Configuración electrónica	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁴
Primer potencial de ionización	9.82 eV
Punto de ebullición	685 °C
Punto de fusión	217 °C
Calor de fusión	6694 kJ/mol
Presión de vapor	0.695 Pa a 494K
Electronegatividad	2.48
Calor específico	320 J/ (Kkg)
Conductividad eléctrica	1.0x10 ⁻⁴ S/m
Conductividad térmica	2.04 W/(Km)

Tabla 1. Propiedades generales Selenio.^[2]



La configuración electrónica externa $3d^{10} 4s^2 4p^4$ y su posición en la Tabla Periódica, hacen que las propiedades fisicoquímicas sean intermedias entre los metales y los no-metales. El selenio presenta tres estados de oxidación (-II), 0, (IV) y (VI).

El estado de oxidación (0) corresponde al selenio elemental, presente en la naturaleza bajo diferentes formas alotrópicas: ^[3]

- Selenio rojo: presenta tres formas cristalinas α -Se, β -Se y γ -Se termodinámicamente estables. Estas variedades presentan geometría monoclinica y estructura vítrea pero diferente estructura molecular. Se presentan en anillos de Se_8 similares a los presentes en α -S o azufre amarillo.
- Selenio gris: posee estructura vítrea helicoidal de geometría hexagonal. El selenio gris tiene características metálicas. Es la forma más estable de este elemento.
- El selenio negro: es amorfo con estructura compleja e irregular formado por anillos polimerizados, y es la forma comercial ordinaria del metal. ^[3,4]

Los estados de oxidación (IV) y (VI) forman compuestos inorgánicos como haluros, óxidos y ácidos.

El selenio presenta propiedades físicas y químicas similares al azufre tanto en sus formas elementales como en sus respectivos compuestos. Pero ambos elementos no llegan a sustituirse *in vivo*. Esto se debe en parte al diferente comportamiento redox de sus estados de oxidación más importantes. Es decir, mientras los oxoácidos de Azufre (VI) tienden a oxidarse, los de selenio (VI) tienden a reducirse. Este hecho produce que los compuestos de selenio presentes en seres vivos tienden a reducirse mientras que los de azufre a oxidarse.^[1]

Por otro lado, aunque los oxoácidos de azufre y selenio, presenta estructuras y características ácidas similares, el H_2Se es un ácido mucho más fuerte que el H_2S por lo que el poder reductor del H_2Se es mayor. Esta diferencia, es muy importante en la química de $-SH - SeH$ en aminoácidos y proteínas. Debido a la diferencia entre sus valores de pK ($pK -SeH= 5.2$; $pK -SH=10.29$) ^[5,13], a pH fisiológico el grupo $-SH$ permanece en forma protonada mientras que el SeH estará en forma disociada. ^[6,29]

Existen seis isótopos del Selenio: ^{74}Se (0,89%), ^{76}Se (9,37%), ^{77}Se (7,63%), ^{78}Se (23,77%), ^{80}Se (49,61%), ^{82}Se (8.73%).^[7]

La abundancia de este elemento en la corteza se estima en el $7 \times 10^{-5}\%$ por peso, encontrándose en forma de seleniuros de elementos pesados y en menor proporción como selenio libre asociado con azufre elemental. Como fuente comercial de selenio se emplean minerales de sulfuro de cobre seleníferos debido a que los minerales de selenio no se encuentran en la cantidad suficiente para emplearlos como fuente comercial.^[8]

3.2 Selenio Orgánico

El selenio orgánico está presente en los compuestos organoselénicos que se definen como compuestos químicos con enlaces selenio-carbono.

Los estados de oxidación del selenio inorgánico: selenato, selenito, selenio elemental y seleniuro, se encuentran presentes en la naturaleza convertidos por los sistemas biológicos en formas orgánicas. El estado de oxidación (-II), es la forma predominante de los compuestos organoselénicos incluyen selenoles, diselenuros, selenóxidos, selenonas, ácidos de selenio, selenuros, haluros de selenio y compuestos selenoheterocíclicos (Perrone et al, 2015). Los organoselenios son importantes intermediarios en la síntesis orgánica, en la deshidratación de aldehídos y cetonas a compuestos α -carbonilo insaturados o en la oxidación de alquenos a alcoholes (Holleman y Wiberg ,2001).^[6]

Las propiedades de los compuestos organoselénicos son similares a sus derivados de azufre (sulfurados), por lo tanto, podemos decir que los selenoles, seleniuros y selenóxidos corresponden a sus derivados de azufre tioles, sulfuros y sulfóxidos. Este hecho produce que los compuestos de azufre y de selenio presentan estructuras similares, pero presentan diferente estabilidad y ruta de síntesis.

El radio atómico e iónico, la electronegatividad y el potencial de ionización son similares entre el selenio y el azufre este hecho permite que el selenio sustituya al azufre e impulsa la química de interacciones azufre-selenio en sistemas biológicos.

Las diferencias entre las propiedades fisicoquímicas del selenio y azufre constituyen la base de sus roles específicos. Los selenoles (R-SeH) y los tioles (R-SH) de gran

importancia para los sistemas bioquímicos, presentan diferencias químicas que afectan a las constantes de disociación y al carácter nucleófilo.

Los selenoles son ácidos más fuertes que los tioles; el pK_a del grupo sulfhidrilo de la cisteína es 10.29, mientras que el grupo selenohidrilo de la selenocisteína es de 5.2. En consecuencia, a pH fisiológico, los selenoles en gran medida existen en forma ionizada, mientras que los tioles casi no se disocian. Además, los selenoles de proteína generalmente se disocian a pH fisiológico, y esto influye en su importante función catalizadora.

El átomo de selenio tiene mayor polarizabilidad que el átomo de azufre, esta característica unida a las diferencias de pK_a (de los compuestos de S y Se) entre los dos átomos nos hacen concluir que el átomo de selenio presenta una mayor nucleofilia con respecto al azufre en un rango más amplio de pH. Por lo tanto, podemos considerar que la Sec presenta una mayor reactividad que la Cys y que la formación del selenoanión provoca que los derivados de selenio sean más sensibles a la autooxidación.

El enlace C-Se presenta facilidad para romperse por acción de agentes oxidantes y halógenos que el enlace análogo con un átomo de azufre. Esta característica se atribuye a la facilidad del selenio para oxidarse en comparación con el azufre. ^[1,6,9,29]

Las principales moléculas de selenio orgánico son los selenoaminoácidos, selenopéptidos y selenoproteínas (Maseko et al, 2013).^[6]

3.2.1 Selenoaminoácidos

Los aminoácidos proteicos presentan una estructura formada por un grupo amino y un carboxílico unidos al mismo carbono denominado: carbono α . El carbono α a su vez está unido a hidrógeno y a otro grupo característico de cada aminoácido.

Estos aminoácidos presentan un carbono asimétrico denominado alfa en consecuencia pueden existir en principio dos formas L y D que describen la actividad óptica del aminoácido. La serie de aminoácidos denominado L son las responsables de los aminoácidos de las proteínas.

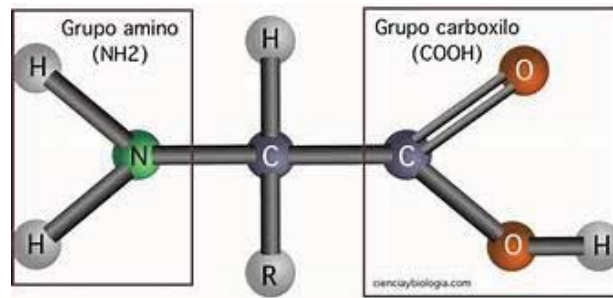


Ilustración 1. Estructura base de un aminoácido. [11]

Los selenoaminoácidos, generalmente provienen mediante reemplazo de metionina por selenometionina, o selenoproteínas, resultado de la inserción de selenocisteína codificada genéticamente por un codón UGA específico. [5]

3.2.1.1 Selenometionina

La SeMet es un aminoácido análogo a la Met. Un azufre de la L-Met es sustituido o reemplazado por un átomo de selenio, este aminoácido se aloja en almacenes proteicos incorporándose a las proteínas de manera aleatoria en lugar de la Met, el cual al ser catabolizado libera selenio en forma de seleniuro. [15]

Se trata de un compuesto quiral, de manera que se puede encontrar en forma L y D siendo más abundante la forma L.

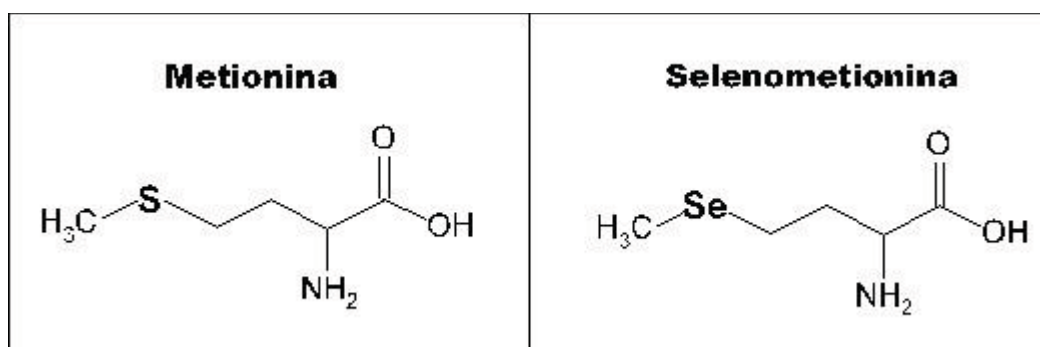


Ilustración 2. Estructura química de la metionina y la selenometionina. [15]

L-seleniometionina como aminoácido primario posee dos constantes de protonación: $pK_1=2.35$ para el grupo carboxílico y $pK_2=9.05$ para el grupo amino [12.] (similares a los de a metionina $pK_1=2.2$ y $pK_2=9.05$) [13].

El selenio y el azufre son calcógenos que comparten muchas propiedades químicas, por lo que la sustitución de la Met por SeMet tiene un efecto limitado sobre la estructura y función de las proteínas. Pero la actividad enzimática sí se puede ver modificada cuando se sustituye el grupo $\text{CH}_3\text{-S}$ de la metionina por el grupo $\text{CH}_3\text{-Se}$ de la seleniometionina en el centro activo, debido a que el grupo $\text{CH}_3\text{-Se}$ es hidrofóbico. Esta diferencia provoca que el acceso al sustrato se vea afectado alterando los parámetros de reactividad cinética.^[13]

A la vista de las diferencias descritas en el apartado 3.2 entre los organoselénicos y organosulfurados cabe esperar que la selenometionina en comparación con la metionina presente mayor reactividad.

La SeMet según Suzuki (2015) se encuentra como residuo de aminoácido en las proteínas y en forma libre en alimentos acumuladores de SeMet. Principalmente proceden de alimentos de origen vegetal y animal ya que esta no puede ser sintetizada por el organismo.

3.2.1.2 Selenocisteína

Las selenoproteínas presentan selenio a partir del 21^{er} aminoácido, la selenocisteína (Sec). La Sec es análoga a la cisteína (Cys), la diferencia entre estas dos proteínas es que la cadena lateral presenta selenio en lugar de azufre. La Sec proviene principalmente de alimentos de origen animal.

Esta proteína se cataboliza directamente sin ser almacenada y el selenio resultante se almacena como reserva. Como precursor de la Sec encontramos el selenofosfato que proviene de selenuro almacenado a partir de selenio inorgánico (selenito y seleniato).

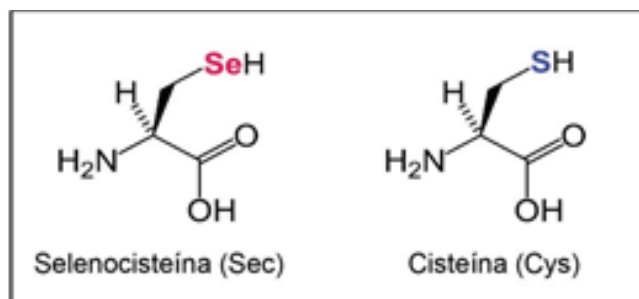


Ilustración 3. Estructura química de la selenocisteína y de la cisteína.

La Sec presenta diferencias con respecto a la cisteína una de las más importantes es el pK del grupo S-H y Se-H, en el caso de la Cys 10.29 ^[13] mientras que la de Sec es de 5.2 ^[6]. Esta variación del pK implica que a pH neutro el tiol de Cys presente forma protonada por lo contrario en el caso de la Sec el selenol se presenta de forma desprotonada (cargado negativamente), pasando a denominarse selenolato (Ilustración 3.).

Las diferencias de pK entre los dos aminoácidos, unidas a las diferencias explicadas en el apartado 3.2 entre los organoselénicos y organosulfurados nos hacen suponer que la Sec presenta una mayor reactividad que la Cys, ^[5,16] de manera que las enzimas que presentan Sec en su centro catalítico son más eficientes que las análogas de Cys. ^[29]

3.3 Importancia biológica de los selenoaminoácidos

3.3.1 Funciones de los selenoaminoácidos

El selenio es un oligoelemento, elemento químico presente en las células de los seres vivos, indispensable para el desarrollo del metabolismo, este elemento posee gran importancia para humanos, plantas y microorganismos. El selenio ejerce a través de los selenoaminoácidos sus principales funciones biológicas; defensa contra el estrés oxidativo, mantenimiento del estado redox celular, la señalización redox, participa en el metabolismo de lípidos e interviene en el metabolismo de la hormona tiroidea. ^[16]

Los selenoaminoácidos son la principal fuente de selenio para el ser humano principalmente en forma de selenometionina y selenocisteína, siendo esta última la forma en la que el selenio se encuentra en las selenoproteínas y la de mayor biodisponibilidad. ^[14]

Estas moléculas se encuentran presentes en muchos alimentos variando la concentración de selenio en función de diferentes factores relacionados con la naturaleza del mismo y las condiciones de origen (dieta del alimento, condiciones de cultivo...). ^[18,19]

3.3.2 Beneficios del selenio en la salud.

El selenio presenta grandes beneficios para la salud del ser humano:

- Regula el sistema inmunitario: producción de linfocitos T y actividad de las células.
- Disminuye la progresión y virulencia de infecciones virales.
- Favorece la movilidad del esperma y estimula la síntesis de testosterona, por lo cual es esencial para la fertilidad masculina.
- Regulación de algunos neurotransmisores en el cerebro, reduciendo la depresión, ansiedad y confusión mental.
- La función tiroidea se ve favorecida debido a que se mejora la producción y regulación de la actividad de la tiroides que provoca la conversión de la hormona tiroidea T4 a su forma activa T3.
- Presenta actividad antitumoral: varios compuestos de selenio han mostrado una posible capacidad anti-cancerígena, ejercida a través de sus propiedades antioxidantes. En los últimos años se realizaron estudios que muestran la relación entre el selenio y la prevención del cáncer. Se ha detectado su efecto anticancerígeno en la inhibición que produce el selenio en la formación del malonaldehído, un producto cancerígeno producido por el daño tisular por peroxidación lipídica. También se ha relacionado el selenio con la capacidad de aumentar la respuesta inmune o la capacidad para producir metabolitos antitumorales. El selenio se emplea como marcador en el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer, por ello se ha observado que este elemento es efectivo en la disminución de la incidencia de cáncer de hígado, pulmón, colón, estómago y páncreas. [14,30,31]

3.3.3 Deficiencia de selenio

El selenio es un elemento importante para la óptima salud humana siempre que se presente en las proporciones adecuadas. La deficiencia de este elemento está asociada a una reducción de la protección antioxidante, el mal funcionamiento del sistema inmune, trastornos cardiovasculares, musculares, endocrina o neurológica y con algunos tipos de cáncer. Los bajos niveles de selenio en el organismo pueden derivar en deterioro cognitivo, infertilidad en hombres o en mortalidad. [18,30]

Destacan varios procesos patológicos relacionados con el déficit de selenio:

- Enfermedad de Keshan: miocardiopatía congestiva causada por deficiencia de selenio en la dieta combinado con otros factores, como la exposición química o la presencia de una cepa mutada del Virus Coxsackie. Es prevalente en niños de 0 a 15 años y en mujeres en edad fértil.
- Enfermedad de Kashin-Beck: Osteoartritis endémica en adolescentes y preadolescentes que afecta a cartílagos, huesos y articulaciones dando lugar a un retraso en el crecimiento o deformidades, restringiendo el movimiento y el agrandamiento de las articulaciones.
- Respuesta Inmune: la deficiencia de selenio en el organismo provoca una peor respuesta a la estimulación por parte de antígenos, una menor capacidad para convertirse en linfocitos citotóxicos y destruir células tumorales, así como la disminución de las células NK (del inglés Natural Killer).
- Infecciones: niveles bajos de selenio se han relacionado con la aparición o progresión de patologías de naturaleza víricas.
- Reproducción: el selenio es necesario para la biosíntesis de testosterona y la formación y desarrollo de los espermatozoides, por lo que su déficit constituye un problema para la fertilidad masculina.
- Estado de ánimo: diferentes estudios relacionan la deficiencia de selenio con depresión y comportamiento hostil.
- Función tiroidea: un déficit de selenio produce una exacerbación de hipotiroidismo.
- Cáncer: se ha relacionado que la deficiencia de este elemento conduce a propensión carcinogénica en diversos tejidos.

Esta deficiencia de selenio se puede revocar incrementando la ingesta diaria de selenio mediante el incremento de alimentos ricos en selenio, adición de selenio al agua potable, preparados farmacológicos, procesos de fortificación en alimentos y complementación alimentaria con selenio de ganado o el uso de selenio como fertilizante para cultivos para incrementar su eficiencia en la absorción de selenio del suelo, este proceso se denomina biofortificación. ^[16]

3.3.4 Toxicidad del Selenio

El selenio es un elemento tóxico cuando la exposición es muy elevada. Los efectos tóxicos del selenio son conocidos desde su descubrimiento y dependen de diversos factores como la forma química, concentración y modificaciones por interacción con el medio ambiente.

La dosis máxima tolerable de selenio es de 300 µg/día si se supera esta cantidad de ingesta diaria podría manifestarse efectos adversos en la salud del individuo.

La sintomatología de la intoxicación de selenio es muy amplia y varía el tipo de intoxicación diferenciándose en toxicidad aguda y crónica (selenosis).^[21]

4. Antecedentes bibliográficos.

4.1 Función antioxidante de los selenoaminoácidos

La función principal de los selenoaminoácidos dentro del organismo es actuar como antioxidante a nivel intra y extracelular. Los antioxidantes son sustancias que protegen a la célula de efectos nocivos de los oxidantes o radicales libres contrarrestando de manera directa o indirecta, los efectos de los mismos.

Los efectos nocivos debidos a los oxidantes son: la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que alteran las funciones celulares. ^[22,23,24]

4.2 Radicales libres

Los oxidantes se producen continuamente en los sistemas biológicos durante la función fisiológica normal, durante procesos patológicos o como respuesta a estímulos. Existe dos tipos de oxidantes: los radicales, que son especies con electrones desapareados y oxidantes de dos electrones.

El término radical libre se utiliza para designar un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados, lo cual lo hace inestable y muy reactivo. Los radicales libres se generan en el interior de las células, en el citoplasma o en las mitocondrias y en la membrana celular. Estos átomos o moléculas presentan, de forma general; inestabilidad, vida media corta y reaccionan de manera rápida con diversos compuestos, pudiendo oxidar biomoléculas y provocar daño molecular y celular.

Dentro de los radicales libres, es significativa la acción del grupo de radicales que contienen oxígeno, siendo estos conocidos como especies reactivas de oxígeno. Esta categoría abarca los radicales libres de oxígeno, como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) y también derivados no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (O_2^\cdot). [22,23]

4.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la situación de desequilibrio entre la formación y la eliminación de moléculas prooxidantes, conocidas como radicales libres (apartado 3.4.1) y los agentes antioxidantes (apartado 3.4.3). La situación de equilibrio alterado entre la formación/reparación en la que se ve favorecido por niveles altos de oxidantes se denomina “estrés oxidativo”.

Los radicales libres se generan deliberadamente por algunas enzimas para realizar funciones biológicas. En la mayoría de los casos, la formación de un oxidante da lugar a reacciones que generan más oxidantes, lo que produce mezclas complejas.

Tradicionalmente el estrés oxidativo se consideraba un proceso estático de daño celular resultante del metabolismo aerobio, actualmente se reconoce su implicación patológica en diversas enfermedades. Este exceso de radicales libres o moléculas prooxidantes provoca reacciones sobre distintos componentes del organismo como los lípidos, proteínas o DNA apareciendo desórdenes fisiológicos promoviendo el desarrollo de determinadas enfermedades.

El estrés oxidativo ha sido asociado a enfermedades como el cáncer, patologías cardíacas y enfermedades neurodegenerativas. [22,23]

4.4 Sistemas de defensa Antioxidante

La presencia de exceso de radicales libres en un organismo se contrarresta mediante los sistemas de defensa antioxidante. Por antioxidante se entiende cualquier sustancia que encontrándose en menor concentración que el oxidante regenerándolo y previniendo oxidación de este.

La capacidad antioxidante celular es regulada mediante mecanismos para la anulación de la reactividad o inhibir la generación de radicales libres.

Existen diversos sistemas de defensa antioxidante, endógenos y exógenos. Los endógenos son generados en el interior de la célula, los más importantes son glutatión (GSH) y el sistema formado por las cuatro enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), superóxidodismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

Los antioxidantes exógenos, son aquellos no sintetizados en las células incorporándose a los organismos mediante la dieta. Entre estos antioxidantes destacan vitaminas, compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) y determinados metales como el zinc, magnesio o el selenio.^[23,31]

4.5 Selenio como sistema de defensa antioxidante

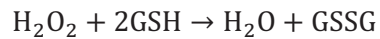
El selenio es un metal fundamental para mantener el balance oxidativo siendo constituyentes de determinadas enzimas antioxidantes presentando además otras funciones antioxidantes.

Este elemento se encuentra en la célula como selenocisteína integrada en el centro activo del glutatiónperoxidasa, pero también en proteínas en forma de selenometionina.

La selenocisteína regula la actividad biológica de 25 selenoproteínas, este hecho le atribuye al selenio propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales. El selenio modula el estrés oxidativo a través principalmente de los diferentes glutationes peroxidasa (GPxs) y por la selenioproteína P (selenioproteína presente en el plasma), reduciendo los niveles de peróxido de hidrógeno, lípidos y fosfolípidos hidroperóxidos.

Las selenioproteínas más abundantes son el glutatiónperoxidasa 1 (GPx1), glutatiónperoxidasa 4 (GPx4) y la selenioproteína P:

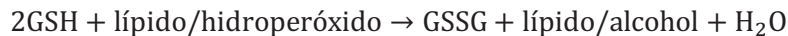
La Gpx1 dependiente de selenio se localiza en el citosol celular protegiendo a estas de fenómenos oxidativos generados por especies reactivas de oxígeno. Cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de algunos hidroperóxidos orgánicos. En esta reacción el glutatión (GSH) actúa como reductor transformando el H₂O₂ en agua o un hidroperóxido orgánico en agua y alcohol. En este proceso el glutatión es oxidado (GSSG), regresando, posteriormente a su estado original mediante la enzima glutatión reductasa (GR).



La GPx1 es muy sensible a los cambios de selenio en el organismo, presentándose en bajos niveles ante la disminución del elemento.

Por otro lado, la GPx4 es una enzima antioxidante que reduce de manera directa los hidroperóxidos de fosfolípidos en las membranas y lipoproteínas. Esta selenoproteína está involucrada en el metabolismo de lípidos como el ácido araquidónico y el linoléico, disminuye la síntesis de leucotrienos de la prostaglandina E, factor activador de plaquetas, favorece la actividad de leucocitos polimorfonucleares y modular la respuesta inflamatoria e inmunológica.

La reacción antioxidante entre el GPx4 y el hidroperóxido o el lípido se describe a continuación:



Esta reacción transcurre en la selenocisteína dentro del centro catalítico de la GPx4. En el ciclo catalítico el selenol (-SeH) se oxida a ácido selenénico (-SeOH), seguidamente este se reduce con glutatión (GSH) a un selenodisulfuro (-Se-SG). Por último, se vuelve a activar la GPx4 por una molécula de glutatión liberando disulfuro de glutatión (GS-SG).

La selenoproteína P es el biomarcador de la cantidad de selenio corporal, siendo la proteína encargada del transporte de selenio en suero y posee capacidad antioxidante. Esta proteína presenta gran relevancia, es muy abundante en el plasma y contiene diez residuos de selenocisteína en lugar de uno, como en el caso de otras selenoproteínas.

La selenoproteína se sintetiza principalmente en el hígado y es la encargada de transportar el selenio desde el hígado hacia otros órganos debido a esto diversos estudios sugieren que la selenoproteína P es un buen indicador de selenio en el organismo.

La selenoproteína P funciona como antioxidante extracelular inhibiendo la actividad de radicales libres como el peroxinitrilo y reduce los fosfolípidos hidroperóxidos actuando con el GSH o la tiorredoxina. [22,31,29]

A continuación se muestra una tabla de las selenioproteínas más estudiadas:

Selenioproteínas	Localización	Funciones
GPx1	Hígado y eritrocitos.	Antioxidantes. Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros peróxidos orgánicos. Actividad antiapoptótica.
GPx2	Aparato gastrointestinal.	Mantiene la integridad de la mucosa intestinal.
GPx3	Plasma, intestino y riñón.	Antioxidante en los fluidos extracelulares. Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros peróxidos orgánicos. Reducción de los hidroperóxidos de fosfolípidos.
GPx4	Testículos, cerebro e hígado.	Antiinflamatoria/S.Inmune. Condensación de la cromatina de las espermátidas. Actividad redox.
Tiorredoxinas reductasas 1,2 y 3.	Todos los tejidos.	Síntesis DNA. Supervisa la actividad de la transcripción, proliferación celular y apoptosis.
Isoenzimas de iodinasas 1,2 y 3.	Diversos tejidos.	Síntesis y degradación de la hormona tiroidea.
Selenioproteína P.	Hígado.	Transporte y distribución de selenio por el plasma. Antioxidante endotelial.

Tabla 2. Selenoproteínas localización y principales funciones. [22]

4.6 Capacidad antioxidante del Selenoaminoácidos.

Recientes estudios determinan que los selenoaminoácidos poseen una alta capacidad antioxidante. Esta propiedad se presenta ante compuestos de alta capacidad oxidante, como son el ácido peroxinitroso, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y ácido hipotiocianoso.

La capacidad reactiva de los selenoaminoácidos, fue determinada sobre la SeMet, que debido a su reactividad mejorada, si se presenta en niveles significativos proporciona protección contra agentes oxidantes. Esta protección está asociada con la conversión de SeMet en SeOMet.

Los estudios aportan datos que nos permiten afirmar que los aminoácidos de selenio establecen mayor protección frente a agentes oxidantes, aportando una respuesta más rápida, ya que estos compuestos tienen constantes cinéticas más altas que los compuestos análogos de azufre. Dichas constantes de la SeMet le permiten competir eficazmente con otros agentes oxidantes como pueden ser Met y el glutatión (GSH).

[32,34]

5. Procedimiento experimental

5.1 Reactivos y preparación de disoluciones

5.1.1 Oxidantes: HClO

En este experimento emplearemos ácido hipocloroso como agente oxidante, se forma a partir de la mieloperoxidasa por reacción con peróxido de hidrógeno catalizada con el ión haluro Cl⁻. Este ácido hipohaloso es un potente agente antibacteriano y un componente del sistema inmunológico.

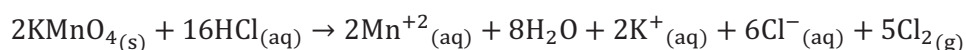
Sin embargo, el exceso de este ácido en el organismo produce daño en los tejidos provocando enfermedades inflamatorias y otras patologías.

El ácido hipocloroso es un oxidante poderoso y reacciona rápidamente con moléculas biológicas.^[34,33]

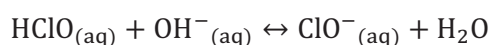
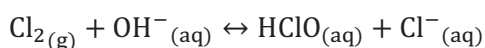
5.1.1.1 Disolución de HClO

Obtenemos la disolución de hipoclorito sódico haciendo pasar un corriente de cloro gas (Cl_2) a través de una disolución de hidróxido sódico.

Para generar la corriente de cloro hacemos gotear una disolución de ácido clorhídrico fumante desde un embudo de presión compensada sobre permanganato potásico presente en un balón de dos bocas.



El cloro gas resultante de la reacción se recoge a través de la otra boca del matraz esférico y se transporta a través de un frasco lavador de gases, que contiene una disolución concentrada de ácido sulfúrico. A continuación, se encuentra un segundo frasco lavador con una disolución de hidróxido sódico. El cloro gas reacciona con dicha disolución formando hipoclorito:



La concentración del hipoclorito sódico generado fue determinada mediante espectrofotometría según el método descrito por Hussain et al. Este método consiste en la medición de absorbancia a $\lambda = 292 \text{ nm}$, sabiendo que a esta longitud de onda el coeficiente de absortividad molar, ϵ , es $350 \pm \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ a valores de pH mayores que 12. [25]

Los reactivos empleados en esta preparación fueron los siguientes:

- Ácido clorhídrico, fumante 37% p.a, Panreac.
- Permanganato potásico p.a, Panreac.
- Hidróxido sódico purum, Panreac.

5.1.2 Disolución de SeMet

Se preparan disoluciones de SeMet disolviendo los aminoácidos directamente en agua. En este experimento empleamos disoluciones de SeMet de diferentes concentraciones.

Se realizan también diluciones para realizar un calibrado a partir de disoluciones madre de selenio-metionina.

Las disoluciones empleadas en el procedimiento han sido almacenadas en el refrigerador y aisladas de la luz.

El reactivo empleado es el siguiente:

- Selenio-L-Metionina 98%, Sigma.

5.1.3 Otras disoluciones

Disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico para obtener medio alcalino o ácido respectivamente. También se realiza una disolución de cloruro sódico, empleada como electrolito inerte para mantener la fuerza iónica constante.

Todas ellas fueron realizadas por pesada directa del reactivo comercial.

- Hidróxido sódico purum, Panreac.
- Ácido clorhídrico, fumante 37% p.a, Panreac.
- Cloruro sódico, Panreac.

5.2 Equipo instrumental

5.2.1 Espectrofotómetros

Para el seguimiento del estudio espectroscópico y cinético de las reacciones de oxidación SeMet se emplearon dos espectrofotómetros ultravioleta-visible.

Un espectrofotómetro de doble haz Biochrom Libra S60 y un equipo ThermoScientific Evolution 201. Los espectrofotómetros están conectados a termostatos permitiendo trabajar a temperatura controlada (± 0.1 C).

Las cubetas empleadas eran prismáticas, de cuarzo, con camino óptico de 1 cm y 3,5 ml de capacidad y provistas de tapón.

Tras comprobar que las reacciones de oxidación presentan un tiempo de reacción muy corto se empleó un espectrofotómetro de flujo detenido modelo SFM-20 de la empresa BioLogic.

5.2.2 Medidas de pH

Para la determinación de pH se empleó un pH-metro Hanna® Instruments combinado con un electrodo de vidrio. La calibración se llevó a cabo con disoluciones reguladoras de la marca Crison de pH=7.02±0.01 (tampón fosfato) y de pH= 4.00±0.01 (tampón ftalato). Las medidas se realizaron a temperatura constante, T= 298.0 K, con termostato.

5.2.3 HPLC-Cromatografía líquida de alta eficacia

Para la determinación de SeMet en disolución y reacción se emplea un equipo de HPLC Spectra System. Este equipo consta de un sistema de suministro y almacenamiento de fase móvil SCM1000, un sistema de bombeo P4000, un sistema de inyección automático más columna cromatográfica AS3000 y un detector UV6000LP que consta de lámparas de deuterio y wolframio. La detección se realiza mediante UV-Vis con un fotodiodo Array. La columna cromatográfica empleada es Kromaphase 100 C18 de fase reversa con dimensiones 250x4.6mm y relleno de 5 µm.

5.3 Mezcla de reacción

En este experimento trabajaremos en condiciones cinéticas de orden 2. Por lo que las concentraciones de los reactivos se encuentran en la misma proporción. Para evitar variaciones en las velocidades y las constantes cinéticas obtenidas trabajaremos con fuerza iónica constante I=0.5M/L y temperatura constante de 298.0K.

Para la realización de la mezcla de reacción se adiciona en las propias cubetas la disolución de selenio-metionina, el electrolito inerte y el agua necesaria. Esta mezcla se homogeniza y se introduce en el carro portacubetas del espectrofotómetro que se encuentra termostatizado hasta que se alcanza la temperatura de trabajo requerida 298.0 K.

Paralelamente se introduce también el agente oxidante en un baño termostático a 298.0 K. Una vez se encuentran termostatizados los reactivos, se podrá adicionar el hipoclorito a la cubeta, se homogeniza la mezcla de reacción y se realizará un seguimiento espectrofotométrico entre 200 y 400nm. Una vez realizado se mide el valor de pH de la mezcla resultante de la reacción.

Las reacciones son muy rápidas, por lo que el seguimiento cinético se realiza en un espectrofotómetro de flujo detenido. Debido a las características del equipo, la preparación de las mezclas de reacción se realizaba de modo diferente.

El sistema de mezcla para este equipo consta de dos jeringas que inyectan el volumen de disolución necesario a la cámara de mezcla. Las jeringas fueron llenadas con la siguiente distribución de reactivos.

Una de ellas contiene SeMet y la otra contiene el agente oxidante en la misma concentración, en ambas jeringas se añade disolución de cloruro sódico para mantener constante la fuerza iónica, las disoluciones se termostatan a 298.0 K.

A continuación, se ajusta la longitud de onda y se realiza el calibrado al instrumento, seguidamente se procede al mezclado de las muestras por medio de un dispositivo accionado por aire comprimido, empujando el contenido de las jeringas hacia la cámara de mezcla donde se registra la variación de absorbancia. De esta manera se pueden obtener tiempos de mezcla en torno al milisegundo.

Para realizarla mezcla de reacción se tuvo en cuenta:

- La fuerza iónica, se mantiene constante, pues de este modo el proceso de mezcla entre ambas disoluciones es óptimo y el tiempo de mezcla es mínimo. Por otro lado, es importante mantener esta propiedad constante debido que las variaciones en la fuerza iónica de la disolución provoca efectos importantes en la velocidad de la reacción.
- La temperatura es un parámetro que afectan a la velocidad de reacción por lo que en este estudio se ha mantenido constante. La explicación está en el hecho de que, al variar la temperatura, varía el número de moléculas con una energía igual o mayor que la energía de activación, con lo que el número de choques efectivos no es constante afectando así a las constantes cinéticas determinadas experimentalmente.

5.4 Estudios espectrofotométricos

Para realizar un seguimiento espectrofotométrico de una reacción química es necesario analizar la aparición de un producto y/o la desaparición de un reactivo, en consecuencia, podemos apreciar una variación en la absorbancia del sistema a una determinada longitud de onda.

En este apartado se recogen los espectros de absorción de los reactivos y reacciones de SeMet estudiadas. En cada caso se señalarán la longitud de onda de mayor variación de absorbancia.

En la figura 5.1 se muestra el espectro de absorción UV/Vis del hipoclorito sódico. En él se puede observar un máximo de longitud de absorción a 292nm, siendo esta la longitud de onda usada para la determinación de la concentración del HClO.

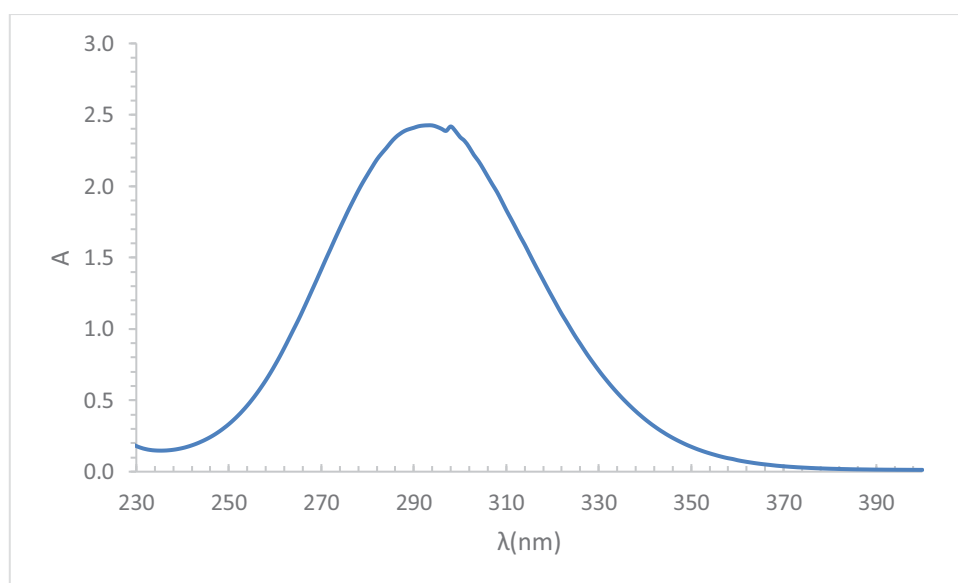


Figura 5.1 Espectro de absorción de HClO, $[\text{HClO}] = 6.9 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} > 12$, $T = 298.0 \text{ K}$.

A partir del valor de absorbancia a 292nm podemos calcular la concentración exacta del HClO generado a partir del método descrito por Hussain et al (Apartado 4.1.1.1).^[25]

La figura 5.2 muestra el espectro de absorción UV/Vis de la SeMet:

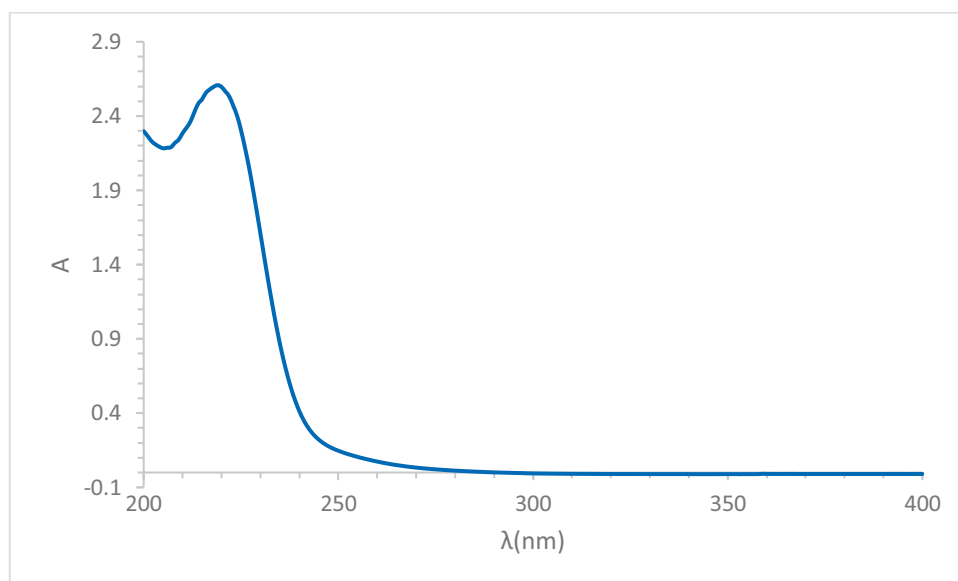


Figura 5.2 Espectro de absorción UV/Vis SeMet, [SeMet]= $1.2 \cdot 10^{-3}$ M·dm⁻³, pH=4.2, T=298.0 K.

A continuación, se muestran los espectros de la SeMet a pH ácido y básico para determinar su estabilidad en función del pH:

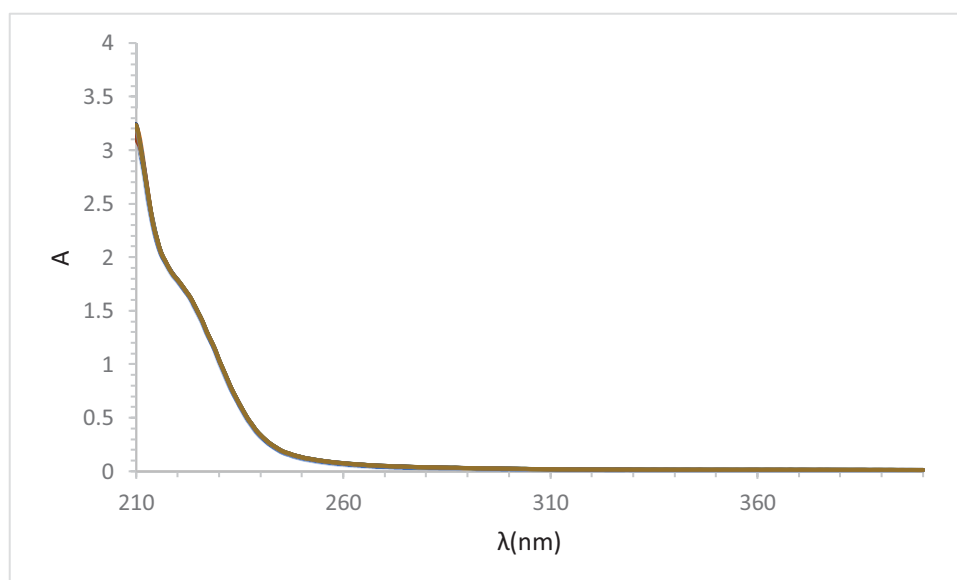


Figura 5.3 Espectro de absorción UV/Vis SeMet, [SeMet]= $1.2 \cdot 10^{-3}$ M·dm⁻³, pH=13, T=298.0 K, t=0-9min.

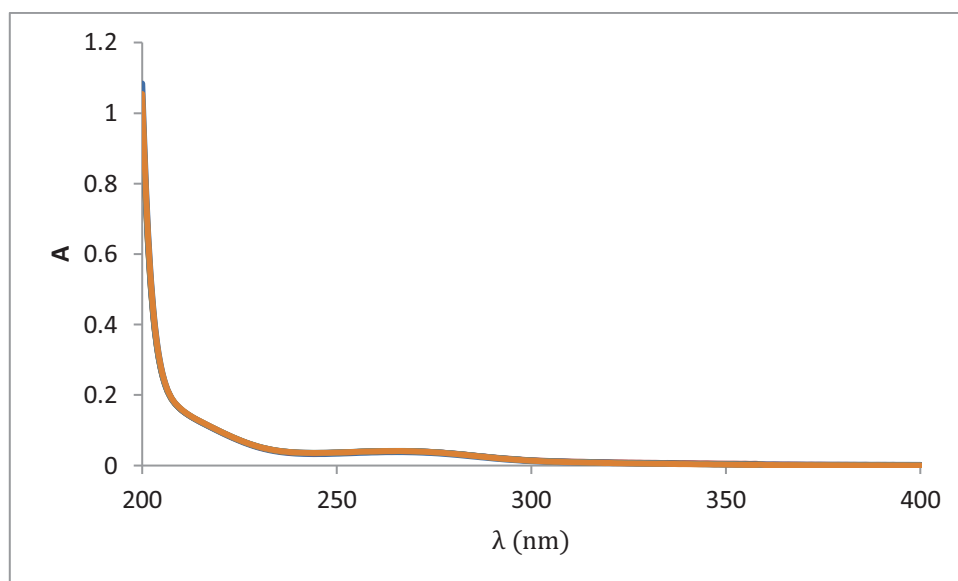


Figura 5.4 Espectro de absorción UV/Vis SeMet, $[SeMet]= 1.2 \cdot 10^{-3} M \cdot dm^{-3}$, pH=2, T=298.0 K, t=0-9min.

A la vista de las figuras 5.3 y 5.4 se observa que no existe variación de absorbancia con el tiempo en medio ácido y básico.

La absorbancia determinada experimentalmente puede ser empleada para la realización del estudio cinético de una reacción, para ello debemos comprobar que existe una dependencia entre la absorbancia y la concentración. Esta dependencia tiene que estar ajustada a la ley de Lambert-Beer.

$$A = [C] \cdot b \cdot \epsilon \text{ (Ec. 4.1.2)}$$

A = Absorbancia b = Camino óptico (cm) ϵ = Coeficiente de absortividad = L/cm · mol

[C] = Concentración del adsorbente (mol/L)

Este comportamiento se determinó midiendo espectros de absorción de SeMet de diferentes concentraciones a 220nm, se selecciona este valor de longitud de onda por ser la de máxima absorción de la SeMet. Representando los valores de absorbancia obtenidos frente a la concentración de SeMet obteniendo:

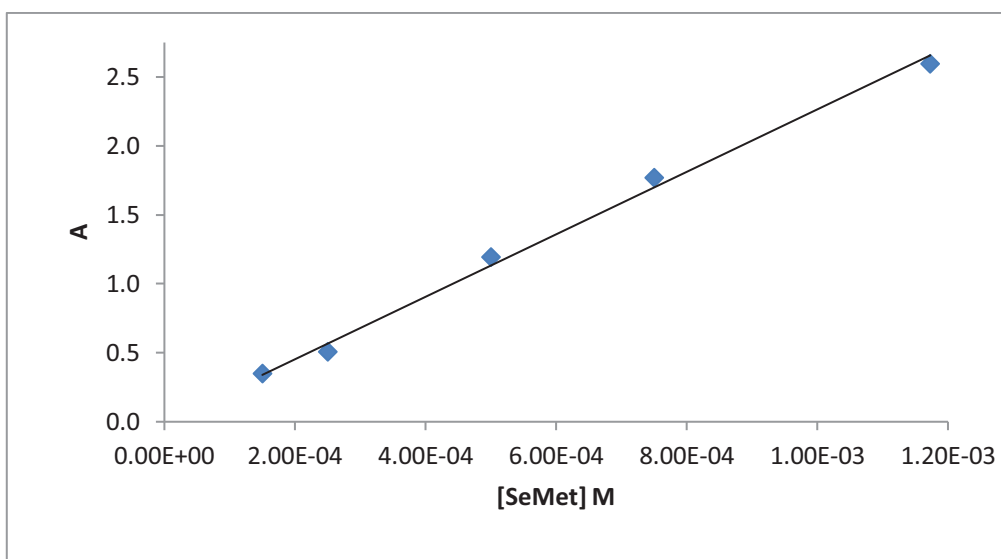


Figura 5.5 Recta de calibrado Ley de Beer-Lambert, SeMet, $\lambda=220\text{nm}$, pH=4.2.

En la figura 5.5 observamos que la SeMet cumple la ley de Lambert-Beer por lo que existe dependencia entre la absorbancia y la concentración:

$$A = 2.265,23[\text{SeMet}]$$

Al comprobarse el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer podemos seguir la reacción mediante medidas de absorbancia en función del tiempo.

En la figura 5.6 se representa los datos de absorbancia obtenidos durante la reacción entre el HClO y la SeMet. Para la obtención de este espectro se realizaron barridos de absorbancia entre 200 y 400nm cada minuto durante 9 minutos.

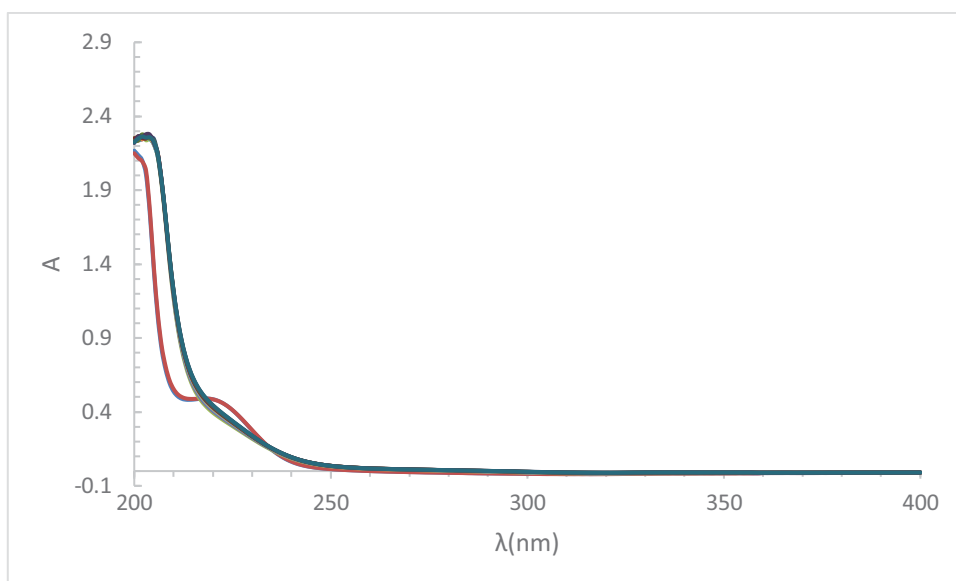


Figura 5.6 Espectro de absorción UV/Vis de reacción, $[\text{SeMet}] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$
 $[\text{HClO}] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 12$, $T = 298.0 \text{K}$, $t = 0 - 540 \text{s}$.

La figura anterior se puede desglosar en dos gráficas que muestran diferentes puntos de la reacción: $t = 0$ a $t = 60 \text{s}$ y de $t = 120 \text{s}$ a $t = 540 \text{s}$.

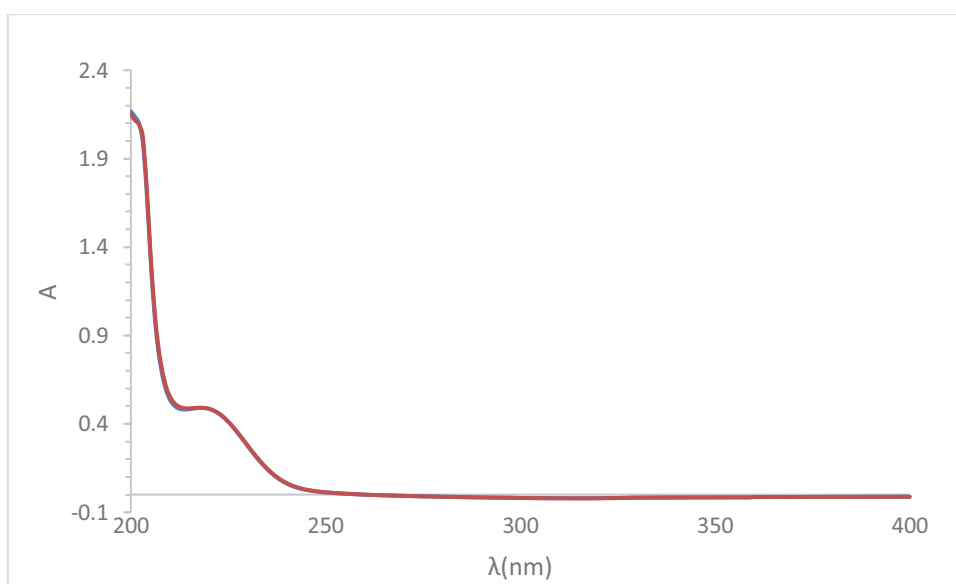
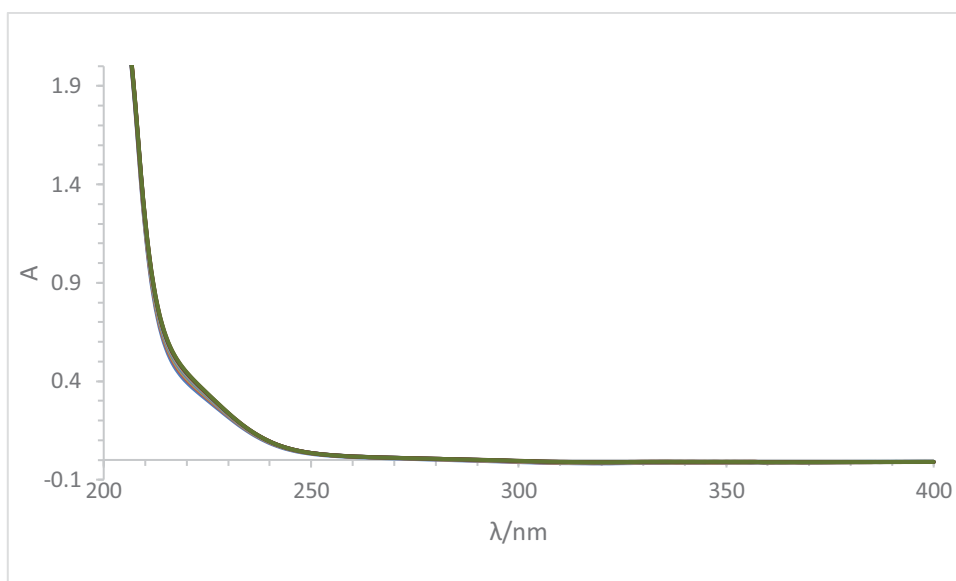
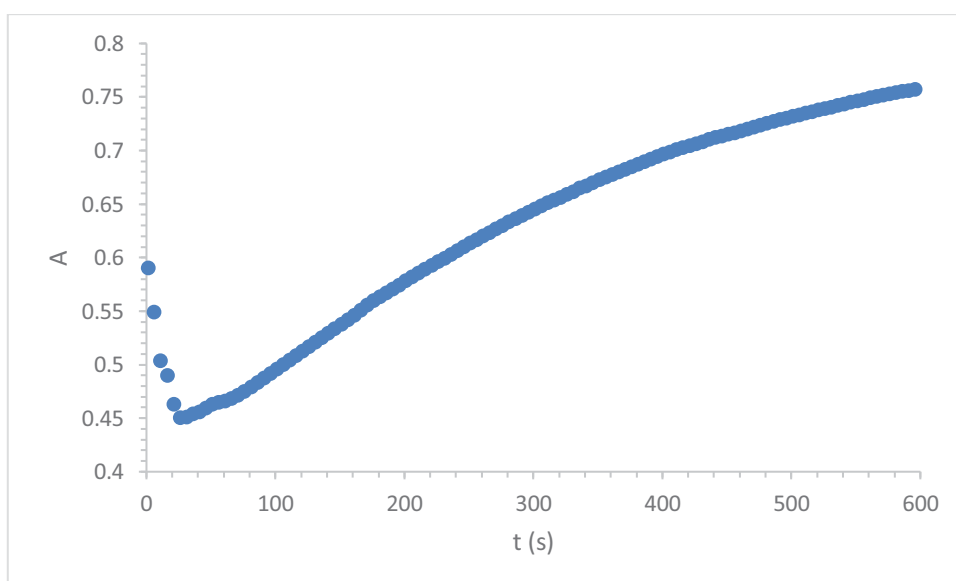


Figura 5.7 Espectro de absorción UV/Vis de reacción, $[\text{SeMet}] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ [$[\text{HClO}] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 12$, $T = 298.0 \text{K}$, $t = 0 - 60 \text{s}$.



**Figura 5.8 Espectro de absorción UV/Vis de reacción, [SeMet]= $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot \text{dm}^{-3}$
[HClO]= $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH=12, T=298.0 K, t=1-9min.**

A continuación, se realiza un estudio de absorbancia en función del tiempo a 220nm en ciclos de 5s con una duración total de 10 min obteniéndose:



**Figura 5.9 Seguimiento espectrofotométrico de reacción $\lambda=220\text{nm}$, [SeMet]= $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot \text{dm}^{-3}$
[HClO]= $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH=12, T=298.0 K, t=0-10 min.**

Teniendo en cuenta los datos obtenidos se determinó como longitud de onda para el estudio cinético 292nm. Este se debe a que a dicha longitud de onda solo absorbe uno de los reactivos, el HClO, este hecho nos permite observar la desaparición del HClO

en el proceso de reacción. Por otro lado, esta longitud de onda nos evita posibles interferencias con posibles productos de reacción.

Seguidamente se realiza cinéticas mediante la técnica de flujo detenido para la reacción entre el HClO y la SeMet a 292nm, para ello se trabaja en condiciones de orden 2, teniendo en cuenta a la hora de la preparación de muestra de reacción la absorbancia mínima inicial de 0.1 u.Abs a longitud de onda del estudio.

Se realizaron medidas variando el pH (HCl 0.1M) del medio de reacción para evaluar el efecto del pH en la constante cinética de la reacción. Obteniéndose representaciones de absorbancia frente al tiempo como la que se muestra a continuación:

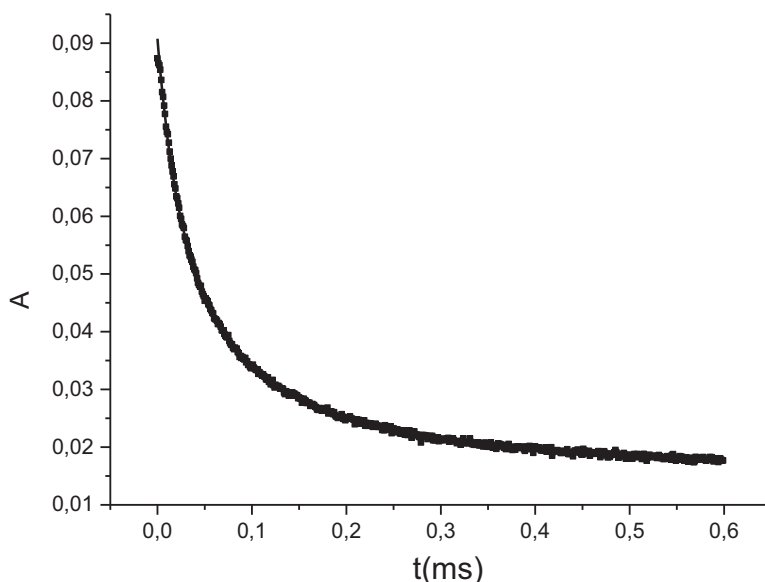


Figura 5.10 Cinética de reacción $\lambda=290\text{nm}$, $[\text{SeMet}] = [\text{HClO}] = 3 \cdot 10^{-4}\text{M}$, $T=298.0\text{K}$, $I=0.5\text{M/L}$, $\text{pH}=11$.

5.6 Estudio cromatográfico

Para la determinación de SeMet y de los productos de reacción se empleará la técnica cromatográfica, HPLC con detección por UV-vis. Para ello, es necesario que exista una relación entre las áreas de los picos cromatográficos y la concentración de los compuestos de estudio.

Se miden diferentes concentraciones de SeMet a longitud de onda de 220nm, se emplea como fase móvil 5% Metanol y 95% Agua y un flujo de 1ml/min en condiciones isocráticas. En este análisis se obtuvo un pico característico a un $t_R \approx 4.2$ min:

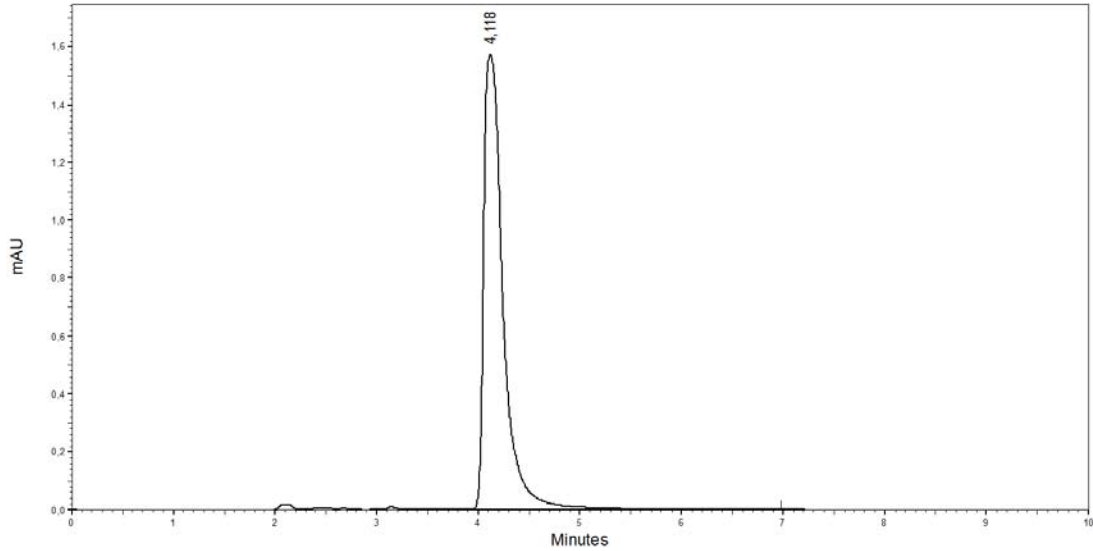


Ilustración 4. Cromatograma HPLC SeMet, $\lambda=220\text{nm}$, 5%Metanol/95%Agua.

Representando las áreas de los picos cromatográficos frente a la concentración de SeMet se obtiene el siguiente ajuste lineal:

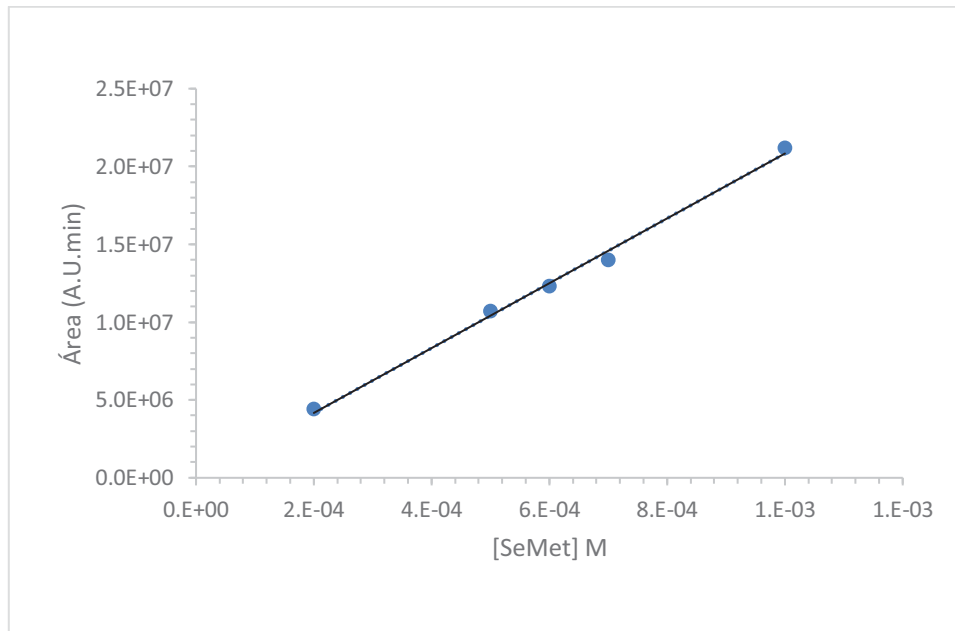


Figura 5.11 Recta de calibrado HPLC, SeMet, $t_R \approx 4.2$ min, $\lambda=220\text{nm}$, 5%Metanol/95%Agua.

El calibrado en HPLC se ajusta a la siguiente recta a $t_R \approx 4.2$ min:

$$\text{Área (A. U. min)} = 2.1 \cdot 10^{10} \cdot [\text{SeMet}](\text{M})$$

Se realiza otro calibrado con una fase móvil tamponada a pH=2.5 (Dihidrogenofosfato/Ácido fosfórico, 1% acetonitrilo, flujo de 1ml/min) con intención de desplazar el pico característico de la SeMet que aparece en el anterior calibrado ($t_R \approx 4.2$ min) a tiempos de retención más altos, esto nos permitirá observar con mayor facilidad la aparición de nuevos picos que pertenezcan a la formación de productos que presenten tiempos de retención menores.^[28]

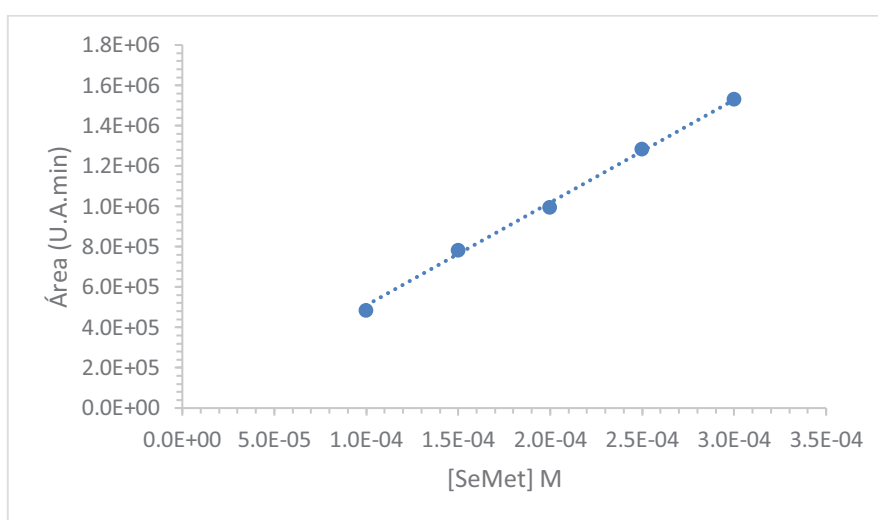


Figura 5.12 Recta de calibrado HPLC, SeMet, $t_R=8.510$ min, $\lambda=220\text{nm}$, 1%Acetonitrilo/90%Agua, pH=2.5.

El calibrado en HPLC se ajusta a la siguiente recta a $t_R = 8.510$ min:

$$\text{Área (A. U. min)} = 5,1 \cdot 10^9 \cdot [\text{SeMet}](\text{M})$$

Una vez comprobamos la relación entre las áreas cromatográficas y la concentración de SeMet se realiza un análisis de reacción con el HClO, a partir de este estudio comprobamos la aparición de un pico cromatográfico a $t_R \approx 3.1$ que corresponde a la formación de un producto de reacción:

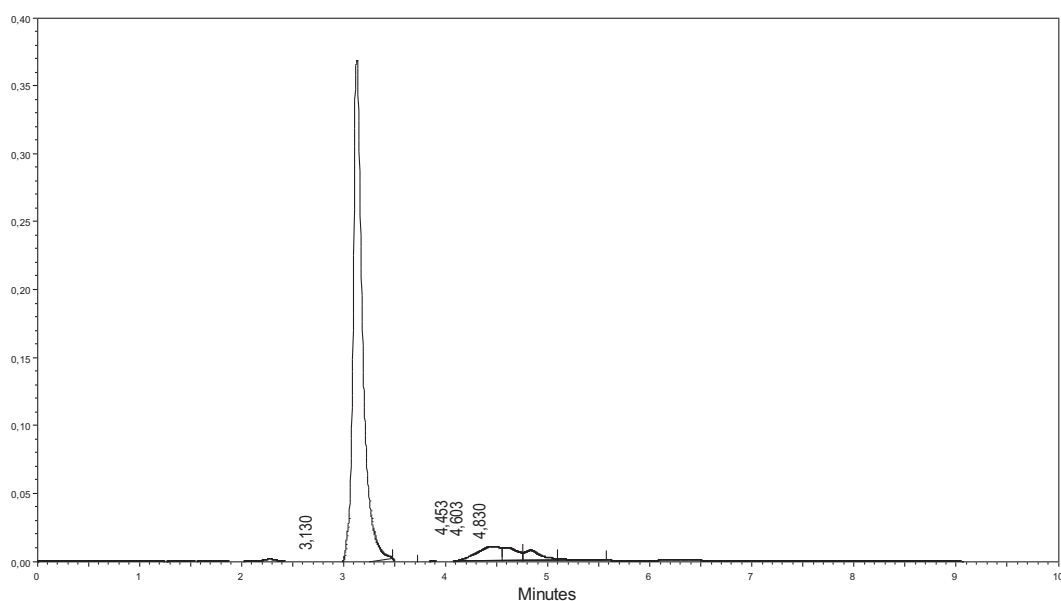


Ilustración 5. Cromatograma HPLC Reacción $[\text{SeMet}] = [\text{HClO}] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, pH=11, Metanol/95%Agua.

Los parámetros para el estudio con HPLC se recogen en la siguiente tabla:

Factores	Calibrado 1	Calibrado 2
Fase móvil	5% Metanol 95% Agua	1% Acetonitrilo 99% Tampón fosfato
Fase estacionaria	Columna C18	Columna C18
Flujo	± 1.0 ml/min	± 1.0 ml/min
pH	7	2.5
Detención	220nm	220nm

Tabla 4. Condiciones análisis HPLC.

6. Tratamiento de datos

6.1 Método cinético

6.1.1 Fundamento teórico.

En reacciones de tipo $A+B \rightarrow C$, sabemos que la velocidad se puede expresar según:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} \quad (\text{Ec. 6.1.1})$$

En condiciones de orden dos, siendo la concentración de A y B iguales podemos decir:

$$v = k \cdot [A]^m \cdot [B]^n$$

$$[A] = [B]$$

$$v = k \cdot [A]^2 \text{ (Ec. 6.1.2)}$$

Igualando las expresiones Ec.6.1.1 y Ec.6.1.2 obtenemos:

$$v = -\frac{d[A]}{[A]^2} = k \cdot dt \text{ (Ec. 6.1.3)}$$

Separando ambas variables:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot dt \text{ (Ec. 6.1.4)}$$

Integrando:

$$-\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = k \cdot \int_0^t dt$$

$$-\left(-\frac{1}{[A]}\right)\Big|_{[A]_0}^{[A]} = k \cdot (t)\Big|_0^t$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k \cdot t \text{ (Ec. 6.1.5)}$$

Partiendo de la Ec.6.1.5 se representa la inversa de la concentración de A frente al tiempo obteniendo una recta de pendiente igual a k.

Si despejamos en la Ec.6.1.5 la concentración:

$$[A] = \frac{1}{k \cdot t + \frac{1}{[A]_0}} = \frac{1}{[A]_0 \cdot k \cdot t + 1} \text{ (Ec. 6.1.6)}$$

La propiedad física empleada para el seguimiento cinético de las reacciones es la absorbancia ya que es proporcional a la concentración medida a la longitud de onda de mayor variación de dicha magnitud.

La absorbancia total de la disolución en una reacción se puede relacionar con la concentración de distintas sustancias mediante la siguiente ecuación:

$$A = A_{\text{reactivos}} + A_{\text{productos}} + A_{\text{fondo}} \quad (\text{Ec. 6.1.7})$$

Los valores de absorbancia en el principio de la reacción ($t=0$), a un tiempo indefinido de la reacción (t) y al final de la reacción ($t=\infty$) se expresa según las siguientes ecuaciones:

$$A_0 = \varepsilon_A \cdot b \cdot [A]_0 + A_{\text{fondo}} \quad (\text{Ec. 6.1.7})$$

$$A_t = \varepsilon_A \cdot b \cdot [A]_t + \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot ([A]_0 - [A]_t) + A_{\text{fondo}} \quad (\text{Ec. 6.1.8})$$

$$A_\infty = \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot [A]_0 + A_{\text{fondo}} \quad (\text{Ec. 6.1.9})$$

Restando Ec.6.1.7 y Ec.6.1.9:

$$A_0 - A_\infty = \varepsilon_A \cdot b \cdot [A]_0 - \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot [A]_0$$

$$[A]_0 = \frac{A_0 - A_\infty}{(\varepsilon_A - \varepsilon_{\text{productos}}) \cdot b} \quad (\text{Ec. 6.1.10})$$

Despejando A_{fondo} en Ec.6.1.8:

$$A_t = (\varepsilon_A \cdot b \cdot [A]_t + \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot ([A]_0 - [A]_t)) + (A_\infty - \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot [A]_0)$$

$$A_t = \varepsilon_A \cdot b \cdot [A]_t - \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot [A]_t + A_\infty$$

$$[A]_t = \frac{A_t - A_\infty}{(\varepsilon_A - \varepsilon_{\text{productos}}) \cdot b} \quad (\text{Ec. 6.1.11})$$

Sustituyendo las expresiones de $[A]_t$ (Ec.6.1.12) en Ec.6.1.5 obtenemos una ecuación que relaciona la absorbancia en un punto de la reacción y la constante cinética (k). ^[26]

$$\frac{1}{[A]_t} = \frac{1}{[A]_0} + k \cdot t = \frac{1 + [A]_0 \cdot k \cdot t}{[A]_0} \quad (\text{Ec. 6.1.5})$$

$$[A]_t = \frac{[A]_0}{1 + [A]_0 \cdot k \cdot t}$$

$$\frac{A_t - A_\infty}{b \cdot \Delta\varepsilon} = \frac{[A]_0}{1 + [A]_0 \cdot k \cdot t}$$

$$A_t = \frac{b \cdot \Delta\varepsilon \cdot [A]_0}{1 + [A]_0 \cdot k \cdot t} + A_\infty \quad (\text{Ec. 6.1.12})$$

6.1.2 Tratamiento de datos cinéticos.

Para el tratamiento de los datos cinéticos se usó el software comercial OriginPro 2020b de OriginLab Corporation. Este software nos permite realizar ajustes no lineales de absorbancia vs tiempo (Figura 6.1) y k_{obs} vs pH (Figura 7.1).

La Ec.6.1.13 nos permite determinar la constante cinética (k) a partir de los datos experimentales de absorbancia frente a tiempo obtenidos mediante flujo detenido:

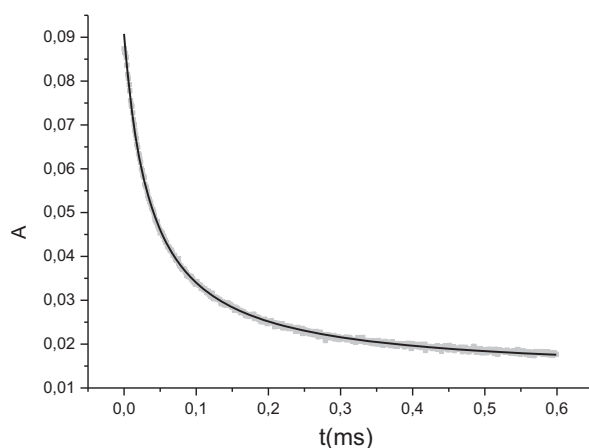


Figura 6.1 Ajuste cinética de reacción $\lambda=290\text{nm}$ $[\text{SeMet}]=[\text{HClO}]=3\cdot 10^{-4}\text{M}$, $T=298.0\text{K}$, $I=0.5\text{M/L}$, $\text{pH}=11$.

Del ajuste de los datos absorbancia vs tiempo obtenidos a diferentes pH se obtienen los siguientes valores para la constante de velocidad observada, estos se obtuvieron como el promedio de dos medidas.

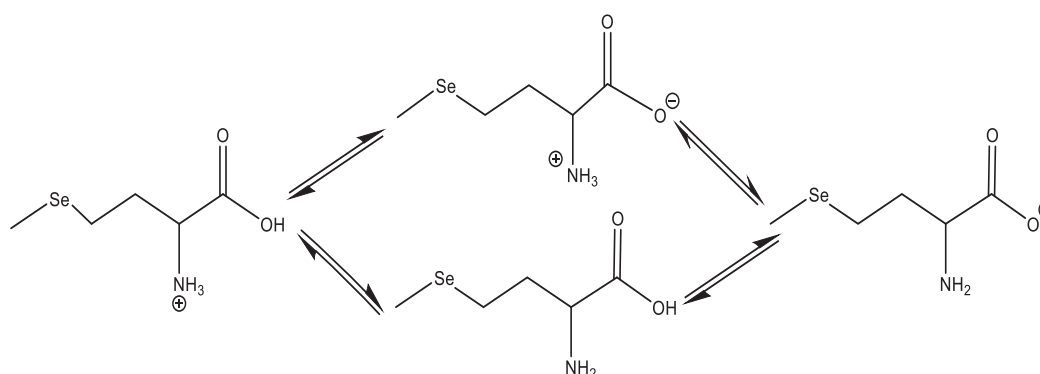
pH	$\langle k_{obs} \rangle$ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	\pm
10.75	$9.4\cdot 10^7$	$0.4\cdot 10^7$
11	$8.5\cdot 10^7$	$0.2\cdot 10^7$
11.3	$8.4\cdot 10^7$	$0.1\cdot 10^7$
12	$8.0\cdot 10^7$	$0.1\cdot 10^7$

Tabla 5. k_{obs} , Ajuste cinética de reacción $\lambda=290\text{nm}$ $[\text{SeMet}]=[\text{HClO}]=3\cdot 10^{-4}\text{M}$, $T=298.0\text{K}$, $I=0.5\text{M/L}$.

7. Resultados y discusión

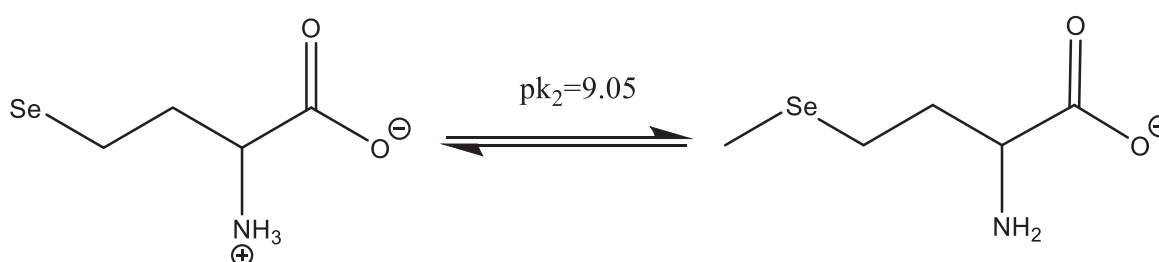
Para poder analizar los datos obtenidos experimentalmente mediante los estudios cinéticos, espectrofotométricos y cromatográficos, es necesario conocer que especies se encuentran presentes en el transcurso de la reacción en las condiciones de trabajo. De esta manera podemos establecer los posibles procesos elementales a partir de los cuales se producen las reacciones estudiadas.

Para determinar el mecanismo de reacción antioxidante de los aminoácidos que contienen selenio se empleó SeMet, este compuesto presenta el siguiente equilibrio ácido-base ($pK_1=2.35/pK_2=9.05$) [12]:



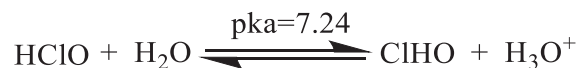
Esquema 1. Equilibrio ácido-base de la SeMet.

Sabiendo que la SeMet en disolución y durante el transcurso de la reacción se encuentra por encima de $pH=2.35$ (Figura 5.2 y 5.6), podemos afirmar que las especies presentes en el mecanismo de reacción son:



Esquema 2. Equilibrio ácido-base presente en la reacción entre SeMet y HClO.

Como agente oxidante se emplea HClO, un compuesto halogenante que en las condiciones de pH de trabajo, las especies presentes en el equilibrio son el ión hipoclorito (ClO⁻) y el ácido hipocloroso (HClO).^[13]



Esquema 3. Equilibrio ácido-base del HClO.^[13]

Siendo las constantes de equilibrio ácido-base de estas especies:

$$K_{\text{SeMet}} = \frac{[\text{NH}_2] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{NH}_3^+]} \quad (\text{Ec. 7.1})$$

$$K_{\text{HClO}} = \frac{[\text{ClO}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HClO}]} \quad (\text{Ec. 7.2})$$

La ecuación de velocidad dependerá de las concentraciones de cada especie en el equilibrio:

$$v = k_1 \cdot [\text{NH}_3^+] \cdot [\text{HClO}]$$

$$v = k_2 \cdot [\text{NH}_3^+] \cdot [\text{ClO}^-]$$

$$v = k_3 \cdot [\text{NH}_2] \cdot [\text{HClO}]$$

$$v = k_4 \cdot [\text{NH}_2] \cdot [\text{ClO}^-]$$

El HClO en esta reacción actúa como agente oxidante y clorante, estas reacciones pueden producirse sobre el grupo amino o sobre el átomo de Se. Observando los datos obtenidos en el estudio espectrofotométrico (Figura 5.6) podemos concluir que estos procesos se llevan a cabo sobre el átomo de Se.

Esto se debe, a que en el análisis espectrofotométrico de la reacción no se aprecia la formación de la banda característica de las (N-Cl) compuestos a 255nm^[13] (Figura 5.6), por lo que suponemos que la cloración/oxidación se produce sobre el átomo de Se. El mecanismo de reacción de la SeMet con HClO viene determinado por el equilibrio ácido/base entre los diferentes reactivos (Esquema 1 y Esquema 3). Sabiendo la que la reacción transcurre a pH básicos (≈11/12) y que los pK_a de los reactivos son: en caso de la SeMet presenta un pK_a(-CO₂H)=2.35 y pK_a(NH₃⁺)=9.2

mientras que la disolución de HClO presenta $pK_a=7.26\pm 0.04$ ^[13], cabría esperar que la reacción de oxidación/cloración transcurriera entre las especies de los Esquemas 2 y 3.^[12]

En definitiva podemos descartar para la dependencia encontrada entre la Kobs y el pH (figura 7.1), los procesos elementales para k_1 y k_2 .

Por lo que se puede decir que las especies en equilibrio relacionadas con la SeMet no intervienen en el mecanismo de reacción. Por lo que:

$$v = k_{\text{HClO}} \cdot [\text{SeMet}]_0 \cdot [\text{HClO}] \text{ (Ec. 7.3)}$$

$$v = k_{\text{ClO}^-} \cdot [\text{SeMet}]_0 \cdot [\text{ClO}^-] \text{ (Ec. 7.4)}$$

Estos procesos elementales son los que se tuvieron en cuenta para los mecanismos de cloración/oxidación.

Expresando la concentración inicial de disolución de HClO se encuentra como la suma de las dos especies en equilibrio:

$$[\text{HClO}]_0 = [\text{HClO}] + [\text{ClO}^-] \text{ (Ec. 7.5)}$$

Despejando la concentración de ClO^- en la Ec.7.2 y sustituyendo en Ec.7.5 obtenemos una expresión que relaciona la concentración inicial de HClO y la constante de equilibrio de esta especie:

$$\begin{aligned} [\text{HClO}]_0 &= \frac{[\text{ClO}^-] \cdot [\text{H}^+]}{K_{\text{HClO}}} + [\text{ClO}^-] = [\text{ClO}^-] \cdot \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{HClO}}} + 1 \right) \\ &= [\text{ClO}^-] \cdot \left(\frac{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}}{K_{\text{HClO}}} \right) \text{ (Ec. 7.6)} \end{aligned}$$

Si en Ec.7.6 despejamos el valor de $[\text{ClO}^-]$, podemos sustituirlo en la Ec.7.5 de manera que la concentración de HClO queda en función de la concentración de HClO inicial:

$$[\text{ClO}^-] = [\text{HClO}]_0 \cdot \left(\frac{K_{\text{HClO}}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right) \text{ (Ec. 7.7)}$$

$$[\text{HClO}]_0 = [\text{HClO}] + [\text{HClO}]_0 \cdot \left(\frac{K_{\text{HClO}}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right)$$

$$[\text{HClO}] = [\text{HClO}]_0 - [\text{HClO}]_0 \cdot \left(\frac{K_{\text{HClO}}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right) = [\text{HClO}]_0 \cdot \left(1 - \left(\frac{K_{\text{ClO}^-}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right) \right)$$

$$[\text{HClO}] = [\text{HClO}]_0 \cdot \left(\frac{([\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}) - K_{\text{HClO}}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right)$$

$$[\text{HClO}] = [\text{HClO}]_0 \cdot \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \quad (\text{Ec. 7.8})$$

Sustituyendo las Ec.7.7 y Ec.7.8 en las ecuaciones de velocidad obtenemos las siguientes ecuaciones de velocidad que relacionan la k con la concentración de protones:

$$v = k_{\text{HClO}} \cdot [\text{SeMet}]_0 \cdot [\text{HClO}]_0 \cdot \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \quad (\text{Ec. 7.9})$$

$$v = k_{\text{ClO}^-} \cdot [\text{SeMet}]_0 \cdot [\text{HClO}]_0 \cdot \left(\frac{K_{\text{HClO}}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right) \quad (\text{Ec. 7.10})$$

Suponiendo que la velocidad de la reacción es la suma de estos dos procesos:

$$k = k_{\text{HClO}} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} + k_{\text{ClO}^-} \cdot \left(\frac{K_{\text{HClO}}}{[\text{H}^+] + K_{\text{HClO}}} \right) \quad (\text{Ec. 7.11}) \quad [13,26,33]$$

La expresión para la k cinética se puede simplificar teniendo en cuenta que la concentración de protones ($[\text{H}^+]$) es mucho menor que el $\text{pK}_a=7.26\pm 0.04$ del HClO ^[13] podemos despreciar este término en el denominador:

$$k = k_{\text{HClO}} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{HClO}}} + k_{\text{ClO}^-} \quad (\text{Ec. 7.12})$$

Expresando la Ec.7.12 en función del pK_a (7.24 ± 0.4) del HClO y del pH: ^[26,33]

$$k = \frac{k_{\text{HClO}}}{10^{-\text{pK}_a}} \cdot 10^{-\text{pH}} + k_{\text{ClO}^-} \quad (\text{Ec. 7.13})$$

Esta expresión muestra la dependencia entre la constante de velocidad observada con el pH donde k_{HClO} y k_{ClO^-} son las constantes biomoleculares, para el proceso propuesto para la reacción de oxidación/halogenación.

El esquema 4 muestra el mecanismo propuesto para la reacción entre SeMet con HClO donde este reacciona con el átomo de Se del aminoácido obteniéndose el correspondiente catión haloselenonio, siendo SeClMet el producto de reacción.^[13]

Este mecanismo de reacción es similar al proceso de cloración de aminos, Met y Cys^[25], la reacción tiene lugar a través de la transferencia de Cl desde el átomo de oxígeno del HClO al átomo de Se del aminoácido.

Por otro lado, se observa la dependencia de k_{obs} con respecto al pH (Figura 7.1), demostrando una variación de las k_{obs} que decrece a medida que aumenta el pH, hasta llegar a un valor constante distinto de 0. Este hecho representa una vía independiente del pH, que se explica por aceptar la existencia de la reacción entre ClO^- y el átomo de Se.^[13,33]

Comparando los datos obtenidos para k_{obs} con datos bibliográficos de diferentes aminoácidos^[13]:

Aminoácido	k_{ClO^-} ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	k_{HClO} ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
SeMet	$7,9 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^{10}$
Cys	$1,9 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^9$
Met	-	$8,7 \cdot 10^8$

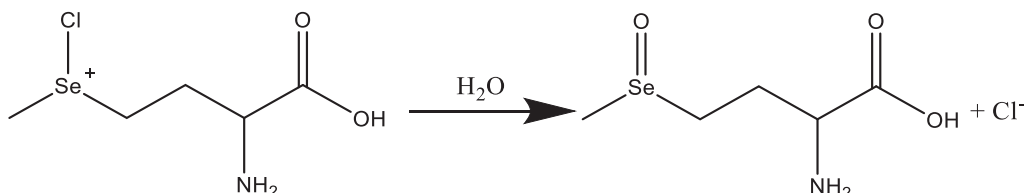
Tabla 7. Comparativa entre las k_{obs} de ClO^- y HClO de diferentes aminoácidos.^[13]

A la vista de los datos recogidos en la Tabla 7 podemos concluir que los aminoácidos derivados de Se son más reactivos y presentan cinéticas más rápidas que los aminoácidos de S frente a agentes oxidantes. En el caso de la SeMet la constante cinética es tan elevada que el proceso de oxidación/cloración está controlado por difusión, es decir, la velocidad se corresponde con el tiempo que tardan en encontrarse los reactivos en el medio de reacción. La explicación para esta diferencia de reactividad y velocidad son la mayor nucleofilia que presenta el átomo de Se en comparación al S.^[13,33]

Como producto principal de la reacción, para la cloración/oxidación de la SeMet se encontró la SeOMet. La formación de SeOMet se determinó mediante análisis cromatográfico de la reacción, obteniendo como resultado un pico cromatográfico asociado al producto de reacción ($t_R \approx 3.1$ min), que corresponde con el producto de descomposición de la SeClMet, la SeOMet (Ilustración 5). El hecho de que aparezca el pico cromatográfico de la SeOMet a menor t_R , se debe a que este compuesto se

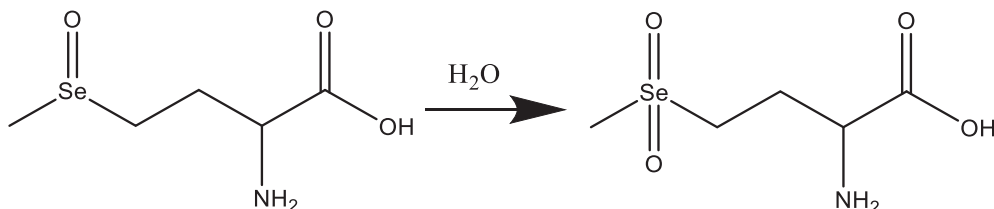
encuentra menos retenido por la columna, en comparación con la SeMet, es decir, la SeOMet es más polar que la SeMet.^[28]

En consecuencia podemos concluir que después de la formación del cloro catión, se produce una hidrólisis que da como producto MetOSe^[27]:



Esquema 5. Mecanismo de descomposición de SeClMet.

En base a los análisis espectrofotométricos de reacción (Figura 5.7 y 5.8), observamos una variación en la absorción de SeOMet a tiempos de reacción mayores (Figura 5.9), esta variación está relacionada con la formación de la correspondiente selenona.



Esquema 6. Mecanismo de descomposición de SeOMet.

Estos resultados experimentales nos hacen concluir que la SeClMet inicialmente formada por la reacción entre la SeMet y el HClO sufre un proceso de descomposición.

El primer paso de la degradación es la formación del SeOMet, este compuesto se produce por la oxidación del átomo de Se, esta reacción puede ocurrir por que sufra hidrólisis o reacciones con especies que se encuentran en el medio (OH⁻).

La oxidación de SeOMet se justifica en vista a los datos obtenidos en la figura 5.9, en esta gráfica se aprecia la variación de absorbancia con respecto al tiempo. Los tiempos de esta reacción son de mayor magnitud que el proceso de cloración/oxidación de la SeMet, por lo que esta variación de absorbancia tiene que ser la reacción de oxidación de la SeOMet y la formación de SeO₂Met.

Para el estudio del rendimiento de la reacción se emplearon los datos obtenidos mediante HPLC, a la vista de las ilustraciones 4 y 5 observamos que el cromatograma de la SeMet (Ilustración 4) presenta un pico cromatográfico a $t_R \approx 4.2$ min, correspondiente al aminoácido. Por otro lado, en el cromatograma correspondiente a la reacción entre la SeMet y el HClO (Ilustración 5) se aprecia la disminución del pico a $t_R \approx 4.2$ min y la aparición de un nuevo pico a $t_R \approx 3.1$ min correspondiente a SeOMet.^[27,28]

A partir de estos datos cromatográficos podemos determinar la cantidad de SeMet que reacciona con el HClO empleando la recta de calibrado para $t_R \approx 4.12$ min (siendo m=pendiente de la recta de calibrado) (Figura 5.11):

$$[\text{SeMet}]_0 - [\text{SeMet}] = [\text{SeMet}]_0 - \frac{\text{Área}}{m} = 2.5 \cdot 10^{-4} - \frac{323369}{2.1 \cdot 10^{10}} = 2.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$$
$$\% [\text{SeMet}]_{\text{reacciona}} = \frac{2.3 \cdot 10^{-4} \text{M}}{2.5 \cdot 10^{-4} \text{M}} \cdot 100 = 94\%$$

En consecuencia podemos decir que en la reacción entre la SeMet y el HClO reacciono el 94% de la SeMet inicial.

8. Conclusiones.

Los resultados obtenidos mediante el análisis espectrofotométrico y cromatográfico durante este estudio, nos hacen concluir que los aminoácidos de selenio presentan unas constantes de velocidad más altas que aminoácidos análogos de azufre. En consecuencia, los aminoácidos de selenio son más reactivos y presentan mayores velocidades de reacción ante agentes oxidantes y halogenantes.

Se determinó que las reacciones entre selenoaminoácidos y compuestos oxidantes/halogenantes se producen sobre el átomo de selenio, dando como resultado selenocloro-aminoácidos.

Por otro lado, también se comprobó la inestabilidad de los selenocloro aminoácidos en medios de reacción y pH básicos, observando que sufren hidrólisis, que deriva en la formación de selenóxidos y selenonas.

Conclusións

Nos resultados obtidos mediante o análise espectrofotométrico e cromatográfico durante o estudo, pódese concluir que os aminoácidos de selenio presentan unhas constantes de velocidade máis altas ca os aminoácidos análogos de xofre. En consecuencia, os aminoácidos de selenio son máis reactivos e presentan maiores velocidades de reacción ante axentes oxidantes e haloxenantes.

Derterminouse que as reaccións entre selenoaminoácidos e compostos oxidantes/haloxenantes podúcese sobre o átomo de selenio, tendo como resultado selenocloro-aminoácidos.

Por outra parte, comprobouse a inestabilidade dos selenocloro aminoácidos nos medios de reacción e a pH básicos, sufrindo hidrólise, que deriva na formación de selenóxidos e selenonas.

Conclusions

The results obtained by spectrophotometric and chromatographic analysis during this study lead us to conclude that selenium amino acids have higher rate constants than sulphur analogue amino acids. Consequently, selenium amino acids are more reactive and have higher reaction rates with oxidising and halogenating agents.

It was determined that reactions between selenoamino acids and oxidising/halogenating compounds occur on the selenium atom, resulting in selenochloro-amino acids.

On the other hand, the instability of selenochloro-amino acids in reaction media and basic pH was also verified, observing that they undergo hydrolysis, which results in the formation of selenoxides and selenones.

9. Bibliografía.

1. Barán PDE. Selenio: La importancia de un elemento de traza esencial [Internet]. Edu.ar. 1997 [consultado el 8 de Mayo de 2021] Pág.39-44.
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/110236/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2. Selenium (Se) [Internet]. Chemistry-reference.com. [consultado el 8 de Mayo de 2021].
3. 2ª Ed. Gutiérrez Ríos. Química Inorgánica. E. Gutiérrez Ríos (Ed.). Reverté. Barcelona. 1984.
4. Corripio Centeno. Z = 34, selenio, Se No hay que ir a la Luna para encontrarlo. Analesdequimica.es. de la RSEQ [internet] 2020 [consultado el 8 de Mayo de 2021]
<https://analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/view/1410/1987>
5. Salinas G. Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. Mensaje bioquímico [internet] 2010 [Consultado 8 de Mayo de 2021]; Vol. XXXIV: 121-133
<http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/92c0927114e753f9b3652f19f3c66b15.pdf>
6. Rodríguez Best, Carmen Alicia. Cuantificación cromatográfica y electrométrica de selenometionina y selenocisteína intracelular de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en función de la concentración de selenito en el medio de cultivo [tesis doctoral]. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Marcos; 2019.
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10686>
7. V. R. Preedy. (2015). Selenium; chemistry, analysis, Function and Effects. Cambridge, UK. Royal Society of Chemistry
8. Selenio (Se) Propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente [Internet]. Lenntech.es. [Consultado el 15 Mayo de 2021].
<https://www.lenntech.es/periodica/elementos/se.htm>
9. T. G. Back. (2011). Selenium: organoselenium chemistry. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry
10. Mañana López et al. Extracción y determinación de selenio y sus especies en nueces de Brasil [Tesis doctoral]. A Coruña: Máster universitario en investigación química y química industrial, Universidad de A Coruña; 2016.
https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17815/Ma%C3%B1anaLopezAdriana_TFM_2016.pdf?sequence=2
11. G. Costas. Los aminoácidos todo lo que tienes que saber [Internet]. cienciaaybiologia.com.Publicado el 24/02/2019 [Última actualización el 17/09/2020, consultado el 15 de Mayo de 2021]
<https://cienciaaybiologia.com/los-aminoacidos-todo-lo-que-tienes-que-saber/>
12. Beena Mishra,K. Indira Priyadarsini Hari Mohan.One-electron oxidation of selenomethionine in aqueous solutions.ResearchGate [Internet].Radiation chemistry & chemical dynamics division,Bhabha atomic research centre;2015.[Consultado 10 de Junio de 2021]

-
- https://www.researchgate.net/publication/238746121_One-Electron_Oxidation_of_Selenomethionine_in_Aqueous_Solutions
13. X. L. Armesto, M. Canle L., M. I. Fernández, M. V. García and J. A. Santaballa, First Steps in the Oxidation of Sulfur-Containing Amino Acids by Hypohalogenation: Very Fast Generation of Intermediate Sulfenyl Halides and Halosulfonium Cations, *Tetrahedron*.2000, Volume 56, Pages 1103-1109.
 14. G. Casals Mercadal, M. Torra Santamaria, R. Deulofeu Piquet, A. M. Ballesta Gimeno. Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química clínica* [internet] 2005 [consultado el 15 de Mayo de 2021] 24 (3) 141-148.
http://zeus.colsanitas.com/manual_referencia/archivos/importancia_del_selenio_en_la_pr.ctica_cl.nica_quim_clin.2005.pdf
 15. Garros Fontinhas y Wanderley Quinteiro Filho, *Adiseo América Latina. ¿Cómo diferenciar las fuentes de selenio disponibles para la industria animal?* [internet]. engormix.com; publicado el 22/02/2021 [consultado el 23 de Mayo de 2021]. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/como-diferenciar-fuentes-selenio-t46707.htm>
 16. Molina Maisincho et al. Selenio: un elemento tóxico y esencial [Trabajo de fin de grado] Madrid: Facultad de farmacia, Universidad Complutense; 2019. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA%20ESTEFANIA%20MOLINA%20MAISINCHO.pdf>
 17. Ečimović Sandra, Velki Mirna, Vuković Rosemary et al. Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere* [internet] Diciembre 2018 [Consultado el 23 de Mayo de 2021] 212, 307-318. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653518315704>
 18. Jane Higdon, Ph.D. Selenio [internet]. oregonstate.edu. Instituto Linus Pauling Universidad Estatal de Oregon. 2001 [última actualización 2017, Consultado el 27 de Mayo de 2021].
<https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/minerales/selenio#suplementos>
 19. Selenio [internet] National institutes of health. [Última actualización 26 de Marzo de 2021, consultado el 27 de Mayo de 2021]
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>
 20. Rui Yang, Yuqian Liu, Zhongkai Zhou. Selenio y selenoproteínas, desde la estructura, la función hasta el recurso alimentario y la nutrición. *J-stage* [internet] 2017 [consultado el 27 de Mayo de 2021]; 23 (3): 363-373. https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/23/3/23_363/article
 21. Paz Ruiz Azcona, Maria et al. Bioacumulación de distintas especies de selenio y sus efectos en organismos marinos [Tesis Doctoral]. Huelva, Universidad de Huelva; 2017. <http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/15083>
 22. Gomes de Figueredo Rua, Rui Manuel et al. Estudio de dos modelos de alcoholización en ratas adolescentes sobre el selenio y los sistemas de defensa antioxidante. Proyección a pacientes alcohólicos crónicos [Tesis Doctoral]. Sevilla, Universidad de Sevilla; 2013.
<https://idus.us.es/handle/11441/56491>

-
23. Venereo Gutiérrez Justo R.. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cub Med Mil [Internet]. 2002 Jun [consultado el 2 de Junio de 2021] ;31 (2):126133.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es
 24. Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea (concepción) [internet]. 2006 [consultado el 2 Junio de 2021];(494):161-172.Disponible en:
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010
 25. Rodríguez Ramos,Adrián.Catálisis intramolecular en las reacciones de descomposición de N-Halo-Aminas. [Tesis de Licenciatura]. A Coruña; Universidade da Coruña.
 26. S.R.Logan. Fundamentos de cinética química. Addison Wesley.Madrid.2001. ISBN:84-7829-030-3.
 27. Ogilby, David I. Pattison, Michael J. Davies,Interaction kinetics of selenium-containing compounds with oxidants,Free Radical Biology and Medicine,Volume:155,2020,Pages:58-68,ISSN:0891-5849
 28. Renee J. Krause, Steven C. Glocke, Anna Rita Sicuri, Sharon L. Ripp,† and Adnan A. Elfarrar,Oxidative Metabolism of Seleno-L-methionine to L-Methionine Selenoxide by Flavin-Containing Monooxygenases,Chem. Res. Toxicol. 2006, Volume 19,Pages 1643-1649.
 29. Ursini Fulvio Ursini and Bindoli Alberto,The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes,Chemistry and Physics of Lipida. 1987,Volume 44, Pages 255-276.
 30. J.Reich Hans,Robert J. Hondal Robert, Why Nature Chose Selenium, ACS chemical biology.2016,Volumen 11, Pages 821-841.
 31. Chenxing Sun, Lu Wang, Banruo Xianyu, Tianyu Li, Shiqian Gao, Huaping Xu,Selenoxide elimination manipulate the oxidative stress to improve the antitumor efficacy,Biomaterials,Volume 225,2019,119514,ISSN 0142-9612.
 32. Rahmanto AS, Davies MJ. Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. IUBMB Life. 2012 Nov;64(11):863-71.doi: 10.1002/iub.1084. PMID: 23086812
 33. Pattison,D.I.; Davies, M. J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. Chem. Res. Toxicol. 2001, 14, 1453–1464.
 34. Skaff O, Pattison DI, Morgan PE, Bachana R, Jain VK, Priyadarsini KI, Davies MJ. Selenium-containing amino acids are targets for myeloperoxidase-derived hypothiocyanous acid: determination of absolute rate constants and implications for biological damage. Biochem J. 2012 Jan 1;441(1):305-16. doi: 10.1042/BJ20101762. PMID: 21892922; PMCID: PMC3242511.