



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL MECANISMO DE REACCIÓN
ENTRE EL HEXACIANOFERRATO DE POTASIO (III) Y HEMOGLOBINA**

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA

JORGE MARTÍNEZ GUERRA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. José Alejandro Baeza Reyes

VOCAL: Profesor: Dr. José Luz González Chávez

SECRETARIO: Profesor: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. Silvia Citlalli Gama González

2° SUPLENTE: Profesor: M. en C. Arturo de Jesús García Mendoza

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA, INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA EXPERIMENTAL.
ANEXO 3F, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES

SUSTENTANTE:

JORGE MARTÍNEZ GUERRA

Contenido

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Objetivos e hipótesis general.....	9
Capítulo 1 Antecedentes generales.....	10
1.1 Hemoglobina.....	11
1.1.1 Generalidades.....	11
1.1.2 Propiedades fisicoquímicas.....	13
1.1.3 Métodos de cuantificación de hemoglobina.....	13
1.2 Hexacianoferrato de potasio (III)	14
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	14
1.3 Medio de reacción: Trishidroxiamino metil metano.....	15
1.3.1 Propiedades fisicoquímicas.....	15
Capítulo 2 Electroquímica.....	16
2.1 Generalidades.....	17
2.2 Principios teóricos.....	18
2.2.1 Reacciones óxido – reducción.....	18
2.2.2 Características fundamentales de la reacción redox electroquímica.....	19
2.2.3 Celdas electroquímicas.....	19
2.2.4 Instrumentación básica y proceso electroquímico.....	21
2.2.5 Doble capa eléctrica.....	25
2.2.6 Curvas I/E.....	26
2.2.7 Aportes en la medición de potencial y corriente.....	27
2.2.8 Consideraciones sobre la cinética de transferencia de masa.....	28
2.2.9 Consideraciones sobre la cinética de transferencia de carga.....	31
2.2.10 Reversibilidad e irreversibilidad.....	33
2.3 Técnicas electroquímicas.....	34
2.3.1 Programa de perturbación transitorios.....	34
2.3.2 Voltamperometría cíclica.....	37
2.3.3 Ecuaciones básicas en voltamperometría cíclica.....	39
2.3.4 Criterios de reversibilidad, irreversibilidad y cuasirreversibilidad.....	43
2.3.5 Reacciones químicas acopladas y mecanismos de reacción en voltamperometría cíclica.....	44
2.3.6 Potenciometría a corriente nula ($i = 0$).....	49
Capítulo 3 Diseño experimental.....	50
3.1 Materiales y Reactivos.....	51
3.2 Sistemas electroquímicos.....	52
3.3 Metodología experimental.....	53
Capítulo 4 Resultados y análisis.....	55
4.1 Parte I. Voltamperometría cíclica.....	56
4.1.1 Estudio voltamperométrico a diferente concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$ a velocidad de barrido fija (100 mV s^{-1}).....	56
4.1.2 Estudio voltamperométrico a diferente velocidad de barrido a concentración fija de $K_3[Fe(CN)_6]$	58
4.1.3 Estudio voltamperométrico a diferente concentración de Hb a velocidad de barrido fija (100 mV s^{-1}).....	65
4.1.4 Estudio voltamperométrico a diferentes velocidades de barrido a concentración fija de Hb.....	69

4.2 Parte II. Caracterización por potenciometría a corriente nula ($i = 0$).....	85
Capítulo 5 Conclusiones y expectativas.....	91
5.1 Conclusiones.....	92
5.2 Expectativas.....	94
Capítulo 6 Bibliografía.....	95

Abreviaturas

Hb	Hemoglobina
$K_3[Fe(CN)_6]$	Hexacianoferrato de potasio (III)
TRIS	Trishidroxiamino metil metano
KNO_3	Nitrato de potasio
HCl	Ácido clorhídrico
EA	Electrodo auxiliar
ET	Electrodo de trabajo
ER	Electrodo de referencia
E	Potencial (V)
E°	Potencial normal (V)
$E_{1/2}$	Potencial de media onda (V)
$E_{p/2}$	Potencial de medio pico (V)
$E^{\circ'}$	Potencial normal condicional (V)
E_λ	Potencial de inversión de barrido voltamperométrico (V)
ΔE	Diferencia de potencial (V)
E_p^c	Potencial de pico catódico (V)

E_p^a	Potencial de pico anódico (V)
I_p^c	Corriente de pico catódica (A)
I_p^a	Corriente de pico anódica (A)
AN	Acetonitrilo
TBAP	Perclorato de tetrabutilamonio
A	Área de la superficie del electrodo (cm^2)
D	Coefficiente de difusión ($cm^2 s^{-1}$)
C	Concentración ($mol cm^{-3}$)
v	Velocidad de barrido ($V s^{-1}$)
α	Coefficiente de transferencia electrónica
n	Número de electrones transferidos
Λ	Párametro de carácter adimensional que define la reversibilidad de un sistema
K°	Constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones
Ox	Oxidante
Red	Reductor
μL	Microlitro
s	Segundo
X	Fracción mol

R	Constante universal de los gases ideales (atm L mol ⁻¹ K ⁻¹)
T	Temperatura (K)
F	Constante de Faraday (96485 C mol ⁻¹)
e ⁻	Electrón
ECS	Electrodo saturado de calomel
E.N.H.	Electrodo Normal de Hidrógeno

Resumen

Se ha demostrado que la señal de electroreducción del hexacianoferrato de potasio (III), $K_3[Fe(CN)_6]$, disminuye de manera proporcional a la concentración de hemoglobina (Hb) en solución, lo cual es aprovechado para la determinación de Hb en muestras de sangre total⁽¹⁾. La interacción entre estos analitos es conocida en la determinación fotocolorimétrica de Hb en medio cianurado⁽²⁾. Sin embargo, no está claro en la literatura el mecanismo de reacción electroquímico que ocurre para optimizar la determinación electroanalítica con las ventajas adyacentes con respecto a los métodos fotocolorimétricos convencionales. Hasta el día de hoy, en la literatura sólo está reportada la siguiente reacción:



En este trabajo se describe el diseño de las condiciones óptimas de electroanálisis para determinar el mecanismo entre la Hb y el $K_3[Fe(CN)_6]$ por voltamperometría cíclica y potenciometría a corriente cero en medio amortiguado utilizando como medio de reacción buffer de trishidroxiamino metil metano (TRIS) y nitrato de potasio (KNO_3) ambos a una concentración de 0.1 M a pH 7.5 en ausencia de cianuro. Para la técnica de voltamperometría cíclica se empleó platino (Pt°) como electrodo de trabajo, una barra de grafito como electrodo auxiliar y plata (Ag°) como electrodo de referencia. Para los ensayos por potenciometría se empleó Pt° como electrodo de trabajo y Ag° compartamentalizada en medio buffer, como electrodo de referencia. Se encontró que la señal de electroreducción del $K_3[Fe(CN)_6]$ disminuye de manera proporcional a la concentración de Hb; además, se confirma una interacción entre estos analitos debido a un posible proceso de reacción química acoplada de tipo complejación múltiple.

Objetivos generales

Diseñar las condiciones óptimas de electroanálisis para determinar el tipo de mecanismo de reacción electroquímico que ocurre entre el $K_3[Fe(CN)_6]$ y la Hb en medio amortiguado (en ausencia de cianuro).

Hipótesis general

Al encontrarse el medio de reacción adecuado, es posible determinar las condiciones de reacción para el $K_3[Fe(CN)_6]$ y Hb tal que, permitan establecer de manera confiable el mecanismo de reacción que ocurre entre estos analitos.

Capítulo 1. Antecedentes generales

*“Triste época la nuestra, es más difícil
destruir un átomo que un prejuicio”*

*Albert Einstein
Físico alemán
(1879-1955)*

1.1 Hemoglobina

1.1.1 Generalidades

La hemoglobina, es la primera proteína cuyas estructuras terciaria y cuaternaria fueron conocidas gracias al análisis por rayos X. Este logro, conseguido por M. F. Perutz y sus colaboradores en Inglaterra, fue la culminación de 25 años de estudio detallado.

La hemoglobina contiene 2 cadenas α y 2 cadenas β , a cada una de las cuales se halla unido un resto hemo mediante enlace no-covalente. La molécula se estudió en su forma oxigenada, la cual posee una estructura esferoidal compacta, cuyas dimensiones son 6.4 x 5.5 x 5 nm. La figura 1.1 muestra el esbozo a baja resolución de las cadenas de hemoglobina, y la figura 1.2 muestra cómo se acoplan las cadenas en una ordenación aproximadamente tetraédrica. Cada cadena posee una conformación irregularmente plegada, en la que ciertos tramos de regiones helicoidales α puras se encuentran separadas por curvaturas.

En la hemoglobina hay muy poco contacto entre las 2 cadenas α y las 2 cadenas β , pero son numerosos los contactos de grupos R entre los pares pertenecientes a cadenas diferentes. Resulta de especial interés la localización de los 4 grupos hemo, uno en cada subunidad, que unen las 4 moléculas de oxígeno. Estos grupos hemo son moléculas planas en las cuales los átomos de hierro forman complejos de coordinación planares cuadrados y se hallan muy separados unos de otros y situados a diferentes ángulos relativos (figura 1.2). Cada uno de ellos se halla parcialmente envuelto en una bolsa forrada por grupos R no polares. El quinto enlace coordinado de cada átomo de hierro se establece con un nitrógeno imidazólico de un resto de histidina; la sexta posición queda disponible para su coordinación con una molécula de oxígeno. Existe una cavidad central dentro de la molécula de hemoglobina, forrada con grupos R polares.

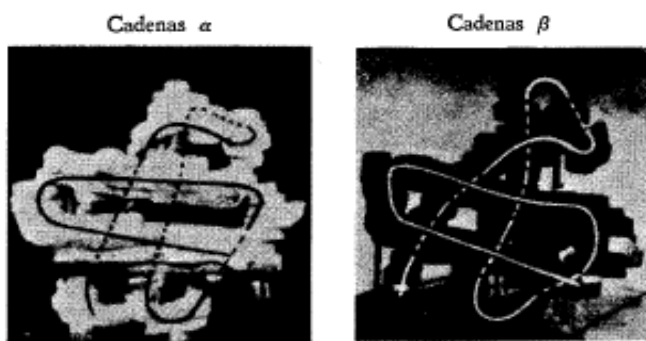


Figura 1.1 Conformación terciaria de las cadenas α y β de la hemoglobina. [De A. F. Cullis, H. Muirhead, A. C. T. North, M. F. Perutz y M. G. Rossmann, Proc. R. Soc. Lond; A 265: 161 (1962)].

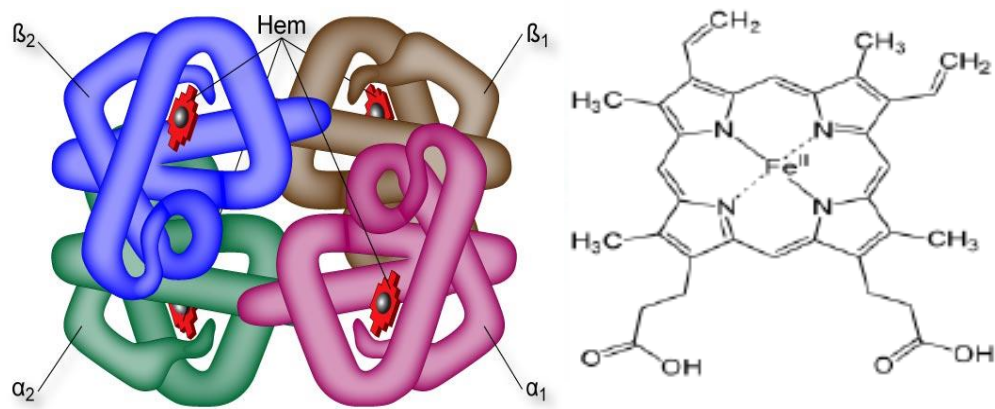


Figura 1.2 Estructura cuaternaria de la hemoglobina (izquierda). Estructura del grupo hemo (derecha).

El análisis mediante rayos X de la desoxihemoglobina muestra que la estructura terciaria de las 4 cadenas de las subunidades es idéntica a la de la oxihemoglobina, pero existe una variación significativa en su estructura cuaternaria, es decir, en el modo como se hallan orientadas las cadenas unas respecto a otras. Mediante desoxigenación, las cadenas α experimentan una rotación de aproximadamente 9° , y las cadenas β de cerca de 7° , pero alrededor de distintos ejes, provocando un cambio en los puntos de contacto entre las cuatro subunidades y la formación de nuevos enlaces iónicos entre ellas. Los dos hemo α se aproximan 0.01 nm, y los dos hemo β se separan aproximadamente 0.65 nm. Así, la unión de las cuatro moléculas de oxígeno, cada una de ellas con un diámetro relativamente pequeño, puede provocar un cambio profundo en la estructura cuaternaria de la hemoglobina.

Los grupos hemo de la hemoglobina presentan al hierro en estado de oxidación $2+$. Cuando éstos se oxidan pasan a hierro en estado de oxidación $3+$, donde la hemoglobina recibe el nombre de metahemoglobina, caracterizada por sufrir una pérdida en su capacidad para captar oxígeno.

1.1.2 Propiedades fisicoquímicas

La hemoglobina es una proteína de masa molar $64\ 000\ \text{g mol}^{-1}$, de color rojo característico, que posee 4 grupos hemo; en los cuales se encuentra un átomo de hierro en estado de oxidación 2+. La hemoglobina utilizada en este estudio es liofilizada, sin embargo, de acuerdo con el catálogo de *Sigma-Aldrich*® no hay información acerca del punto de fusión y ebullición, pH, densidad, umbral olfativo, solubilidad en agua, entre otras propiedades fisicoquímicas comunes.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el potencial estándar de reducción del par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de la hemoglobina a pH 7 es $0.17\ \text{V}$ ⁽³⁾.

1.1.3 Métodos de cuantificación de hemoglobina

Anteriormente los métodos para la determinación de hemoglobina en sangre estaban basados en las estimaciones de oxígeno o monóxido de carbono, o en el contenido de hierro. De todos los métodos sólo el de cianometahemoglobina ha ganado pluralidad y aceptación oficial. La técnica general fue propuesta por *Stodie (1920)*, este método utilizó reactivos separados de ferrocianida alcalina y de cianuro. Posteriormente *Drabkin y Austin (1935)* presentan un solo reactivo. En 1958 el Consejo Nacional de Investigación de Canadá recomienda el uso del método de cianometahemoglobina basándose en investigaciones hechas por el Departamento Médico Militar de los Estados Unidos de América. En 1966 el Comité Internacional de Estandarizaciones en Hematología aprobó la propuesta de que todos los laboratorios clínicos debieran adoptar este método exclusivamente. Posteriormente la Organización Mundial de la Salud (1984) con participación del Comité Internacional de Estandarizaciones en Hematología ratifica el uso del método de Drabkin como método oficial para la determinación de hemoglobina en sangre humana.

El método de Drabkin se basa en la conversión de la hemoglobina de una muestra de sangre en cianometahemoglobina, ya que en un medio alcalino, el hexacianoferrato de potasio (III), oxida la hemoglobina y sus derivados a metahemoglobina (compuesto colorido) que a su vez se combina con iones cianuro proveniente de la sal de cianuro de potasio a pH 7.2, convirtiéndose en cianuro de hemoglobina (también llamada cianometahemoglobina). La intensidad del color es proporcional a la concentración de hemoglobina por lo que se puede realizar una determinación fotolorimétrica a 540 nm. La cuantificación se hace relacionando la absorbancia de la muestra problema con los valores obtenidos en la determinación de una curva patrón de hemoglobina estándar.

El reactivo de Drabkin actualmente está compuesto de hexacianoferrato de potasio 0.6 mM, cianuro de potasio 0.7 mM, buffer y estabilizantes.

Existen otros métodos de cuantificación utilizando HPLC mediante columnas de intercambio iónico (*Persee & Kaplan, 1990*), o incluso métodos electroquímicos (*Venkat 2010*).

1.2 Hexacianoferrato de potasio (III)

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas

Es una sal de color rojo característico, es inodora y es un compuesto altamente oxidante. La descomposición de esta sal en presencia de medios ácidos produce compuestos tóxicos tales como el cianuro de hidrógeno. Es ampliamente utilizado en electroquímica como estándar interno, para evaluar el potencial de otros sistemas redox.

El par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]/[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ presenta un potencial de 0.356 V con respecto al electrodo normal de hidrógeno (E.N.H).

El hexacianoferrato de potasio (III) presenta una densidad de 1.890 g mL^{-1} y una alta solubilidad en agua, 315 g L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Su disolución presenta una ligera fluorescencia verde-amarilla.

La estructura química se muestra a continuación en la figura 1.3.

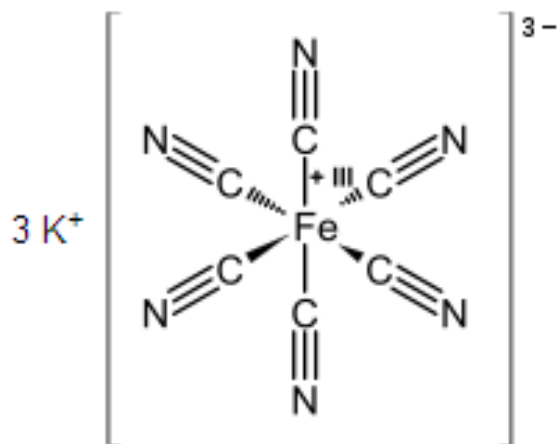


Figura 1.3 Fórmula desarrollada del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

1.3 Medio de reacción: Trishidroxiamino metil metano (TRIS)

1.3.1 Propiedades fisicoquímicas

Tris es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como trishidroxiamino metil metano, de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular, en particular para preparar disoluciones amortiguadoras. Es una amina primaria, con la reactividad típica, por ejemplo la condensación con aldehídos y el establecimiento de un equilibrio ácido-base responsable de su capacidad tamponante).

La estructura química se muestra en la figura 1.4.

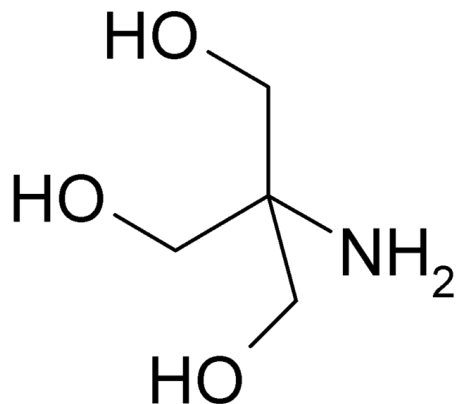


Figura 1.4 Fórmula desarrollada de TRIS.

Presenta un pKa de 8.06 lo cual le aporta una capacidad amortiguadora en un intervalo de pH 7.0 (importante para estudios que semejan el pH fisiológico). Su masa molar es de $121.14 \text{ g mol}^{-1}$ y presenta un punto de fusión de $175 \text{ }^\circ\text{C}$. Es higroscópico. Reacciona con agentes altamente oxidantes.

Capítulo 2. Electroquímica

*“Dejamos de temer aquello
que se ha aprendido a entender”*

*Marie Curie
Física y Química polaca
(1867-1934)*

2.1 Generalidades

La electroquímica analítica puede definirse como el estudio de los procesos de reacción que ocurren en la interfase conductor – disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa, con el objetivo de resolver un problema de tipo químico.

Los procesos de reacción son el conjunto de eventos que ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación del tipo eléctrico. De todos los procesos de reacción, el principal es la reacción electroquímica y la magnitud de su respuesta dependerá de los demás eventos que la acompañen. Éstos transcurren durante la imposición de la perturbación y dependen del tiempo y la manera en que ésta se mantiene. Al cesar la perturbación se alcanza un nuevo estado de equilibrio. De acuerdo con el tipo de perturbación que se imponga será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá el tipo de información que se obtendrá para caracterizar a las moléculas, las reacciones al electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación. Si se impone una diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor – disolución. Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo con la manera en que realizan mediciones y la perturbación del sistema de acuerdo con el siguiente diagrama (Baeza & García 2011), como se muestra en la figura 2.1.

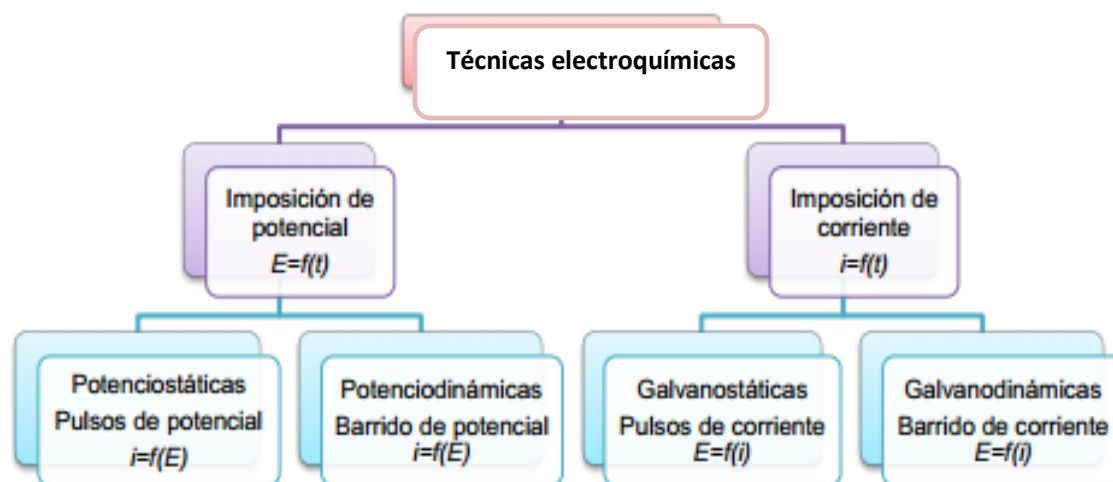


Figura 2.1 Clasificación de técnicas electroquímicas.

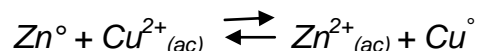
Los métodos electroquímicos forman un pilar importante en el análisis rutinario y permiten explicar fenómenos que hasta su concepción habían resultado indescifrables.

2.2 Principios teóricos

2.2.1 Reacciones óxido – reducción

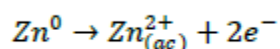
Una reacción de óxido-reducción se puede dividir en dos partes o semirreacciones: una en la cual la especie reactiva se oxida, y otra en la cual la especie reactiva se reduce. Se tiene el siguiente caso:

Ecuación 2.1

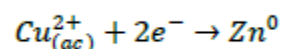


En donde el Zn° se oxida y el Cu^{2+} se reduce de acuerdo con las siguientes semirreacciones:

Ecuación 2.2



Ecuación 2.3



El desplazamiento neto del equilibrio dependerá de la posición relativa de los pK_r de los pares redox involucrados y la imposición o no, de un estímulo externo. Se hablará de un sistema homogéneo cuando las especies reactivas se encuentran en la misma fase, por ejemplo en disolución acuosa; sin embargo, en los sistemas heterogéneos existen dos o más fases. En electroquímica se manejan sistemas heterogéneos, donde la primera fase puede estar constituida por un electrolito, como una disolución líquida, una sal fundida o bien, un líquido iónico. La segunda fase puede ser otro electrolito, un conductor sólido o bien una membrana semipermeable. Los conductores pueden ser metales o bien semiconductores y el analito, la especie química en estudio, puede estar presente tanto en la disolución líquida, en la sal fundida o formar parte de los conductores o las membranas semipermeables.

2.2.2 Características fundamentales de la reacción redox electroquímica

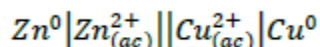
La reacción redox electroquímica es una reacción de transferencia de carga interfacial, particularmente de electrones de un par redox en una interfase a otro, en otra interfase, mediante el empleo de conductores eléctricos. Poseen las siguientes características:

- Son reacciones en sistemas heterogéneos: ocurren en una interfase *conductor sólido – disolución*, donde ésta puede tener naturaleza acuosa o no, ser una membrana o un líquido iónico.
- Están fuera del equilibrio: dependen del tiempo, ya que las concentraciones de las especies que participan cambian con éste en las cercanías de la interfase.
- Son unidireccionales: el intercambio de electrones va de una especie hacia la otra, por medio de conductores, y fluye del ánodo donde una especie cede electrones (se oxida por consecuencia) al cátodo donde otra especie los recibe (y por tanto se reduce).
- Son compartimentalizadas: la interfase *conductor sólido – disolución* donde ocurre la reacción de interés, debe estar separada de la otra para evitar interferencias. Esto se logra utilizando membranas de vidrio poroso, geles iónicos (puentes salinos), o membranas de polímero semipermeable. También se pueden utilizar microelectrodos con una gran separación entre ellos utilizando volúmenes de disolución grandes.

2.2.3 Celdas electroquímicas

Experimentalmente se trabaja con una colección de interfases llamada celda electroquímica, que de manera general se define como dos electrodos separados por al menos una fase electrolítica. Así, la reacción de Zn^0 con Cu^{2+} se puede esquematizar de la siguiente manera:

Ecuación 2.4



En la Ecuación 2.4, la línea vertical representa una interfase sea líquido – líquido, sólido – sólido o sólido – líquido como en el ejemplo; la doble línea vertical indica una barrera denotada por un puente salino que cierra el circuito eléctrico sin que se pongan en contacto ambas disoluciones. Algunas membranas selectivas y materiales especiales como el vidrio poroso pueden actuar como agentes separadores de semiceldas electroquímicas. Para indicar que dos o más componentes se encuentran en la misma fase se utiliza una coma como separador

entre ellos. Algunos aspectos como la concentración, el disolvente en el que se encuentran inmersos, el estado de agregación de los componentes o la presión de los gases suele indicarse en esta notación. Las celdas electroquímicas redox en las que interviene una corriente de electrólisis se pueden clasificar como galvánicas o electrolíticas, como se ilustra en la figura 2.2.

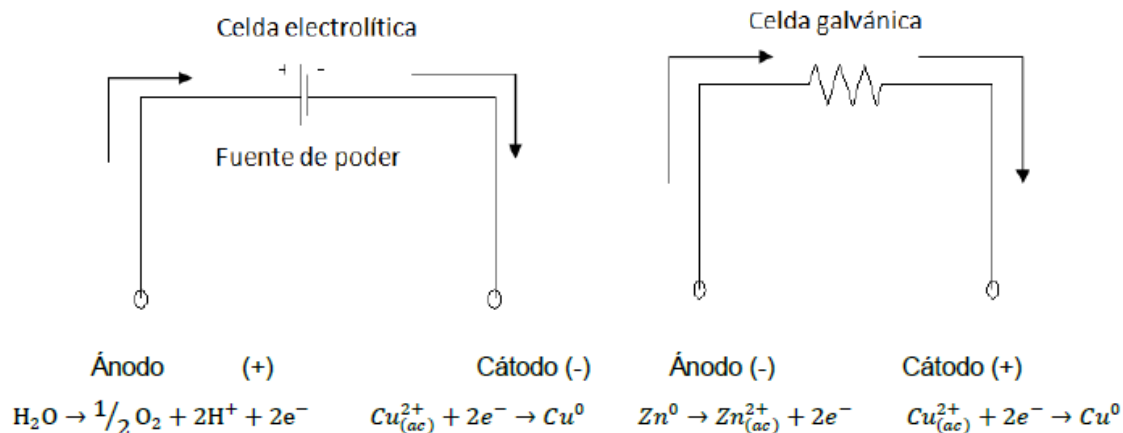


Figura 2.2 Diagrama esquemático de una celda electrolítica (izquierda) y una galvánica (derecha).

- En una celda galvánica, la reacción electroquímica acontece de manera espontánea y la energía química se transforma en energía eléctrica. Esto se debe a que uno de los analitos es un reductor (un donador redox) con un E° menor al que tendrá el otro analito que es un oxidante (un aceptor redox) con un E° mayor comparativamente, sobre una escala de E.
- En una celda electrolítica la reacción electroquímica se lleva a cabo por la imposición externa de un voltaje mayor al del potencial reversible de celda. También es posible la imposición de una corriente de electrólisis que permita la transformación electroquímica de los analitos en el medio. Este tipo de celdas se utilizan en la electrosíntesis de diversos compuestos, en el análisis de parámetros fisicoquímicos o bien, en la dilucidación de mecanismos de reacción.

En ambas celdas, el electrodo en el que ocurre la reducción se llama cátodo; mientras que el electrodo en el que ocurre la oxidación se llama ánodo. Por tanto, para que se lleve a cabo la reacción electroquímica se debe provocar una perturbación de carácter eléctrico y como consecuencia se obtiene una respuesta de tipo eléctrico, de donde se obtiene información del compuesto analizado y los procesos de reacción en la interfase *conductor sólido – disolución* que acompañan a la reacción.

2.2.4 Instrumentación básica y proceso electroquímico

En un sistema electroquímico se forma un arreglo de dos interfases *conductor sólido – disolución*, que están compartimentalizadas. Las reacciones electroquímicas redox de cada semicelda se llevan a cabo en las inmediaciones de cada electrodo (figura 2.3).

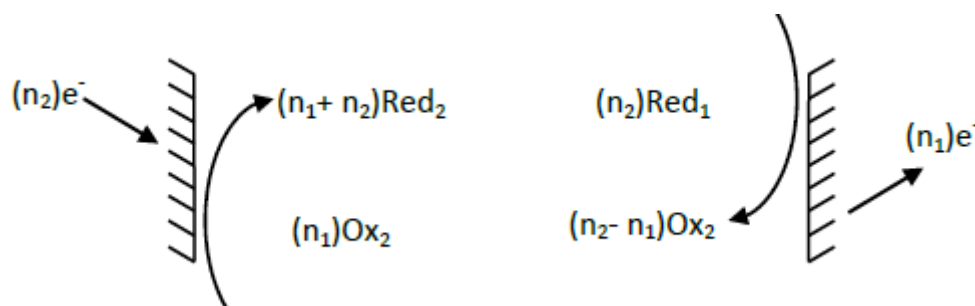


Figura 2.3 Representación esquemática de las reacciones que acontecen al electrodo. Izquierda, una electroreducción en el cátodo cargado negativamente. Derecha, una electrooxidación en el ánodo, cargado positivamente.

En la práctica sólo se monitorean los procesos que ocurren en una de las interfases y es en aquella donde se limita la respuesta del analito de interés. En estos sistemas electroquímicos se utilizan tres electrodos para controlar y monitorear una reacción electroquímica:

- Electrodo de trabajo (ET): Sirve para la caracterización de las reacciones electroquímicas de interés. Sobre este electrodo se realiza la imposición de potencial o corriente. Se simboliza como —°
- Electrodo auxiliar (EA): Sirve para cerrar el circuito eléctrico de la celda. Sobre este electrodo acontece el proceso electroquímico contrario al que pasa sobre el ET. Se simboliza —^\perp
- Electrodo de referencia (ER): Sirve para fijar la variación de los parámetros que se utilizan para caracterizar las reacciones electroquímicas como producto de la medición del potencial que se genera en el electrodo de trabajo. En consecuencia, su composición debe ser constante y conocida. El potencial del electrodo de referencia es fijo, por lo que cualquier cambio en la celda es atribuible al electrodo de trabajo. De esta manera, decimos que observamos o controlamos el potencial del electrodo de trabajo con respecto a la referencia. Muchos autores describen al ER como un amortiguador redox controlado^{(11) (12) (13)}. Se simboliza —^\rightarrow .

El sistema básico para el monitoreo electroquímico se muestra en la figura 2.4. Este arreglo corresponde al MIMP III (Minimal Instrumentation Micro-Polarograph III), construido a partir de materiales de bajo costo⁽¹³⁾.

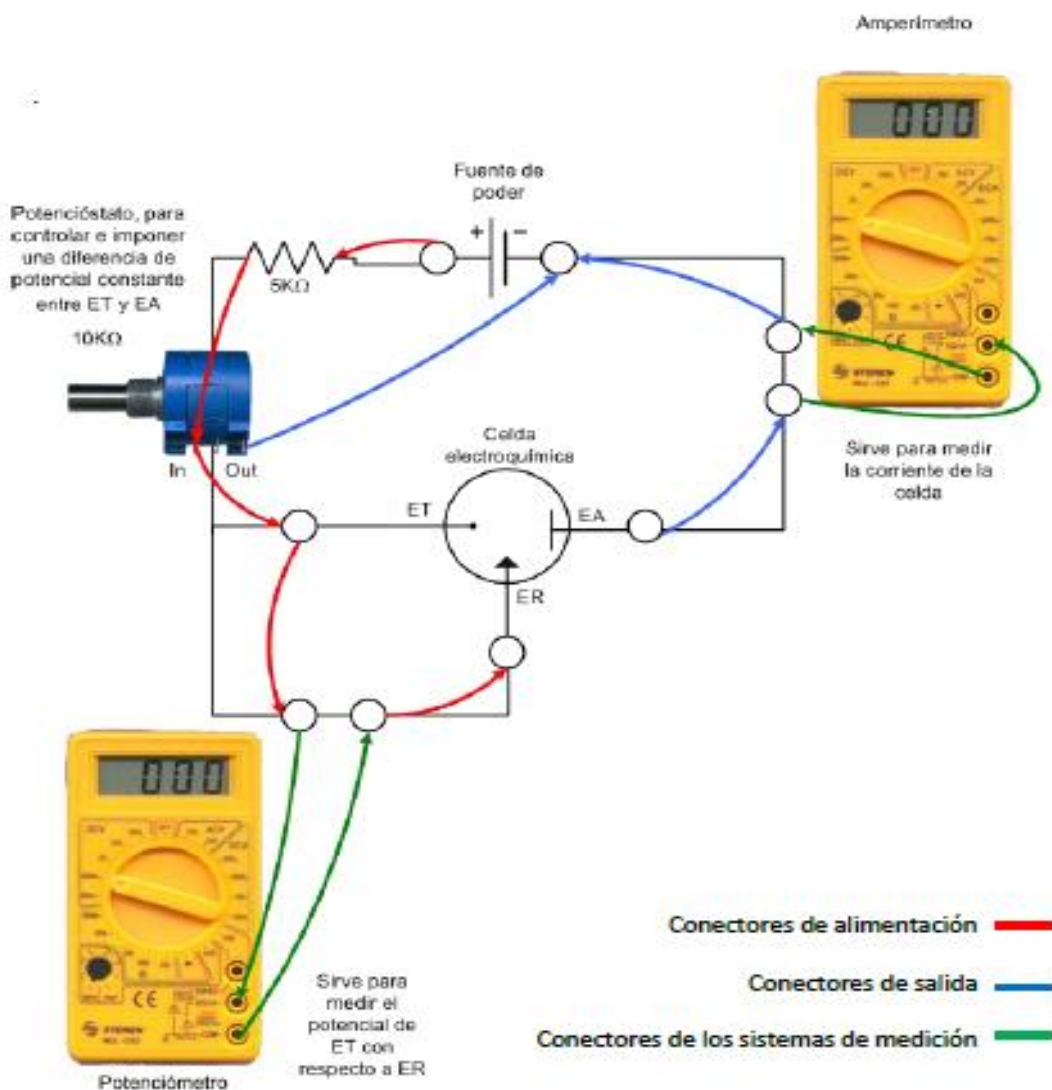


Figura 2.4 Diagrama para un sistema básico y de mínima instrumentación para la investigación electroquímica.

El esquema de la figura anterior se compone de un circuito principal en serie, que comunica la fuente de poder, el reóstato (potenciostato), el electrodo de trabajo, la celda, el electrodo auxiliar y un amperímetro. Un segundo circuito en paralelo, permite medir el potencial aplicado a la solución con respecto a la referencia. En principio, todo equipo comercial de investigación consta esencialmente de las mismas partes.

Los procesos de reacción son el conjunto de eventos que ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación del tipo eléctrico. Estos procesos pueden englobarse en el esquema de la figura 2.5 donde se ilustran situaciones comunes. De todos los procesos de reacción, el principal es la reacción electroquímica y la magnitud de su respuesta dependerá de los demás eventos que la acompañen. Éstos transcurren durante la imposición de la perturbación y dependen del tiempo y la manera en que ésta se mantiene. Al cesar la perturbación se alcanzará un nuevo estado de equilibrio.

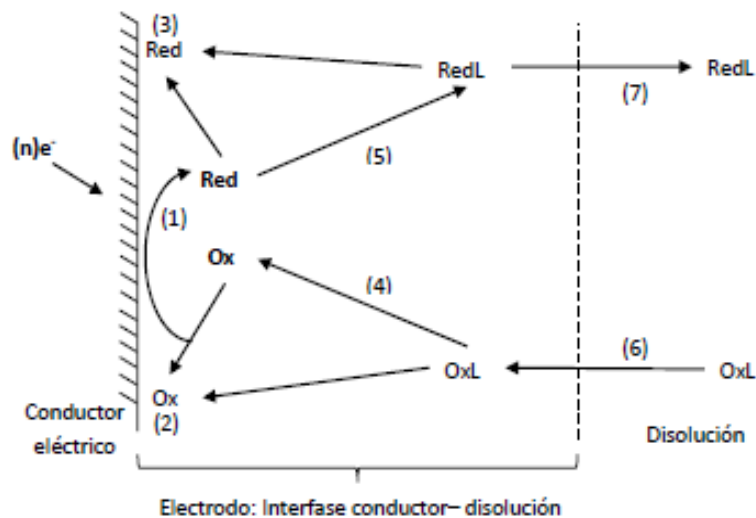


Figura 2.5 Procesos de reacción que ocurren al electrodo al imponer una diferencia de potencial diferente al potencial de equilibrio.

En la figura 2.5 se aprecian los siguientes procesos:

- 1) Reacción electroquímica, en el ejemplo, la electrorreducción de Ox.
- 2) Adsorción del oxidante libre o en forma de OxL, antes de reducirse.
- 3) Adsorción del reductor libre o en forma de RedL, después de producirse por reducción de Ox.
- 4) Disociación del complejo formado por el oxidante y la partícula L en disolución, antes de que se reduzca.
- 5) Formación del complejo RedL (puede ser cualquier otra partícula además de L) una vez producido el reductor al electrodo.
- 6) Transporte del oxidante coordinado (OxL) del seno de la disolución a la interfase electrodo – disolución.
- 7) Transporte del reductor coordinado (RedL) de la interfase electrodo – disolución al seno de la disolución.

Los eventos mostrados se llevan a cabo simultáneamente, a excepción del transporte de masa y el intercambio de electrones; sin embargo, no ocurren necesariamente en el orden propuesto y pueden o no presentarse. La complejidad del proceso de reacción depende, entre otras cosas, de la naturaleza del analito y de la capacidad del medio de reacción para soportar el proceso electroquímico. La aparición de los procesos anteriores (y por ende, el tipo de información que se obtendrá) depende del control de las variables clásicas de una reacción electroquímica: la magnitud y el tipo de la perturbación, el régimen de difusión, la concentración de las especies electroactivas y el tiempo de imposición de la perturbación. El conocimiento y control de estas variables permite obtener una respuesta precisa, reproducible y confiable de lo que acontece en el sistema en estudio. A continuación en la figura 2.6 se presenta un esquema fenomenológico que resume los pasos generales de una reacción electroquímica (Baeza & García 2011).

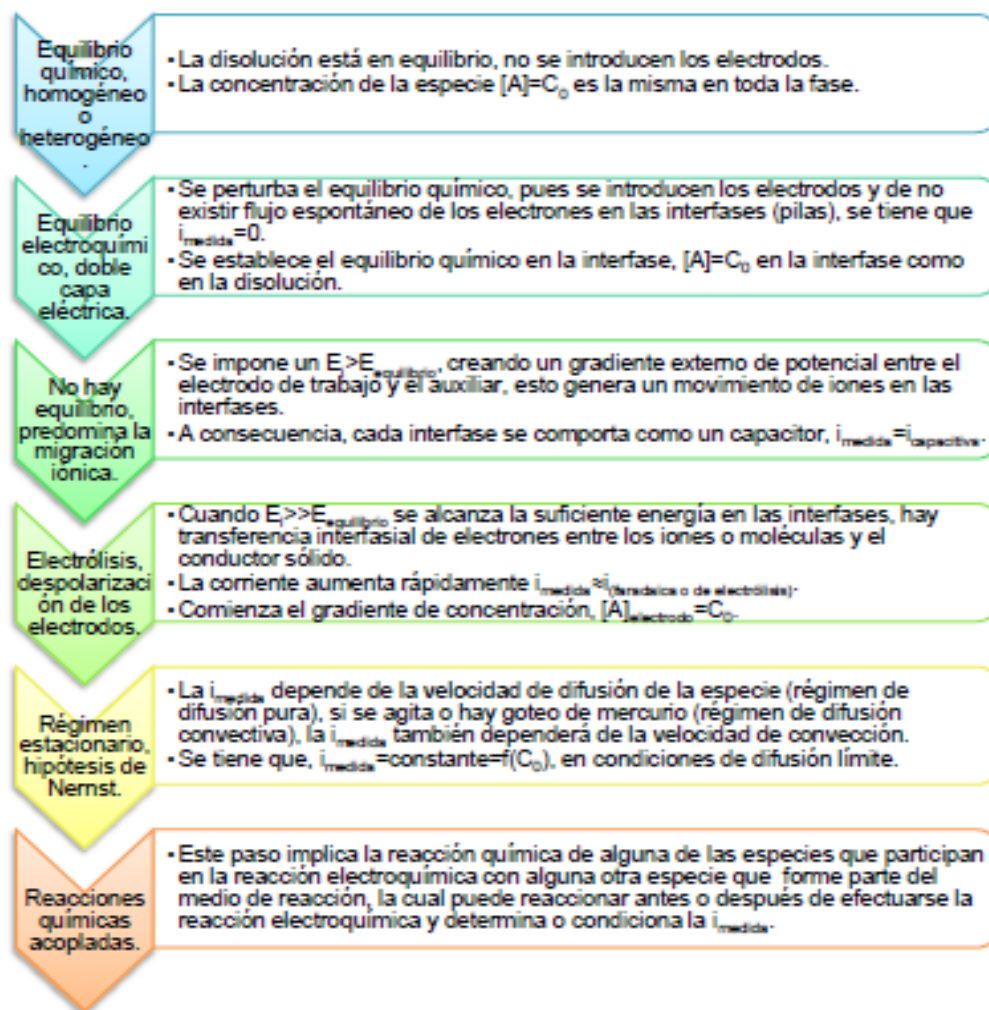


Figura 2.6 Esquema fenomenológico del proceso electroquímico.

Dado que la capa de difusión es muy importante, ya que en ella ocurre la transferencia de carga, se mencionan a continuación algunas de sus características fundamentales.

2.2.5 Doble capa eléctrica

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos hay una polarización de éstos, donde se acumula carga en su superficie y al existir una influencia de un campo eléctrico, los iones de carga contraria a la del electrodo polarizado son atraídos hacia éste y los iones con carga del mismo signo son repelidos, entonces se forma una capa de iones junto a la superficie del electrodo. Esta interface se comporta como un capacitor. En la figura 2.7 se esquematiza este comportamiento.

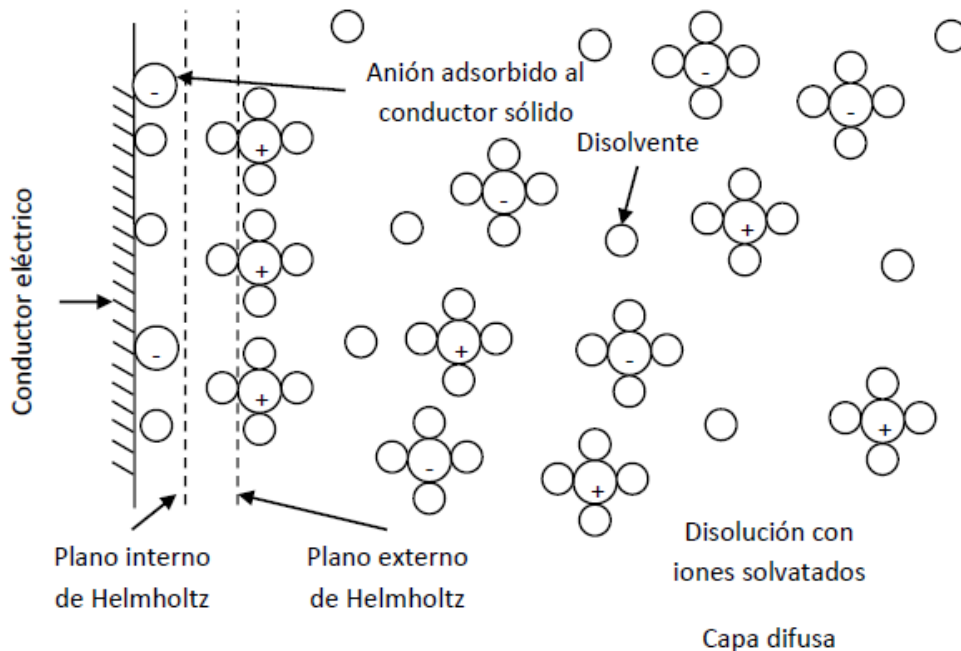


Figura 2.7 Representación esquemática de la doble capa eléctrica del modelo de Bockris, Devanathan y Muller.

Las especies iónicas pueden aproximarse a una distancia x del conductor sólido, a esta distancia se le llama plano externo de Helmholtz. Se forma una capa de iones frente a la superficie polarizado del electrodo y este sistema toma el nombre de doble capa eléctrica (Helmholtz fue el primero en suponer su existencia), los iones pueden estar separados entre sí por medio de moléculas de solvatación. El modelo de la doble capa de Helmholtz (cuyo primer trabajo data de

1850), supone la rigidez de los iones en la doble capa, mientras que Gouy (1910) y Chapman (1913) propusieron su modelo de la capa difusa, en donde los iones son considerados cargas puntuales y tienen una movilidad debido a la temperatura (movimiento térmico). Los iones van del seno de la disolución a la superficie del electrodo, los cuales son simultáneamente atraídos y rechazados en la superficie; sin embargo, los resultados experimentales se ajustan al modelo en un intervalo pequeño. El modelo de Stern involucra a los dos modelos, dando rigidez en la movilidad de los iones en la doble capa y dispersión en el seno de la disolución, supone que los iones pueden llegar a una distancia x del conductor sólido llamada plano de máxima aproximación, la cual está determinada por el radio de hidratación de los iones, por lo que se forman dos regiones, la capa compacta o de Helmholtz y la capa difusa. Graham introduce el concepto de plano interno de máxima aproximación hasta el que pueden llegar los iones adsorbidos. Esta distancia es menor a la de la capa de cationes, los cuales se encuentran en el plano externo de Helmholtz, separados del conductor sólido por las moléculas de disolvente que solvatan a los iones.

El modelo de Bockris, Devanathan⁽²⁵⁾ y Muller involucra los dipolos del disolvente y los iones adsorbidos. En este modelo los cationes están separados del conductor sólido por varias capas de disolvente, no solamente por las moléculas de solvatación. Este modelo puede explicar, entre otras cosas, la adsorción de algunas moléculas orgánicas al electrodo.

2.2.6 Curvas I/E

Si se determina la corriente como una función del potencial impuesto, se obtiene información acerca de la reacción al electrodo de trabajo (de acuerdo con el diagrama de la figura 2.4 y ciertos nombres son asociados con la forma de las curvas obtenidas). De este modo el término polarización se refiere a la desviación del potencial del electrodo de su valor de potencial de corriente nula con el paso de una corriente faradaica. Un electrodo ideal polarizado, es aquel que muestra un cambio considerable en el potencial con el paso de una corriente infinitesimal (figura 2.8, izquierda), éste es el comportamiento de un ET. Un electrodo ideal no polarizado es aquel cuyo potencial no cambia con el paso de una corriente, es decir, es un electrodo de potencial fijo (figura 2.8, derecha), como debe de ocurrir con un ER.

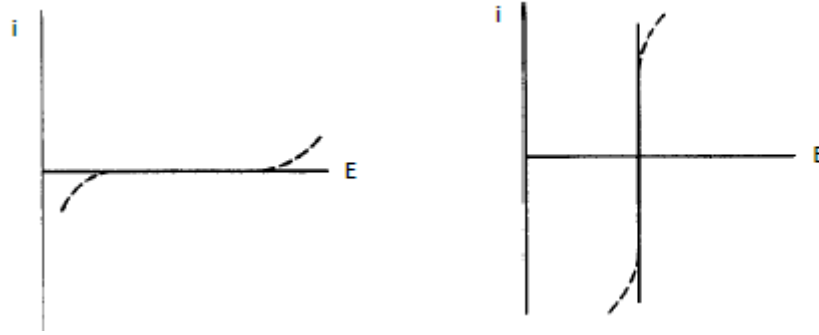


Figura 2.8 Representación esquemática de un electrodo ideal polarizado (izquierda) y un electrodo ideal no polarizado (derecha).

Una medida del grado de polarización es la sobretensión, η , la cual es la desviación del potencial de su valor de corriente nula o potencial de circuito abierto.

Ecuación 2.5

$$\eta = E - E^{\circ}$$

2.2.7 Aportes en la medición de potencial y corriente

Durante la serie de eventos que ocurren en una reacción electroquímica, los parámetros que se registran son la intensidad de corriente y la diferencia de potencial. Cuando se mide esta última, no solamente se mide la que se impone entre los electrodos, sino también se registran distintos aportes:

Ecuación 2.6

$$\Delta E_{\text{medido}} = E_i + E_j + IR - E_{ER}$$

Donde:

- E_i = potencial impuesto mediante el potenciostato.
- E_j = potencial de unión química, debido a la formación de las dos fases iónicas separadas en forma semipermeable cuando se ponen en contacto.
- IR = aporte en el potencial a causa de la resistencia de todo el circuito (conductores, disolución, etc.).
- E_{ER} = potencial del ER

En la práctica los valores de IR y de Ej tienen valores muy pequeños si se usan membranas de separación adecuadas o si se usan microelectrodos y si se trabaja en presencia de sales iónicas concentradas para disminuir la resistencia de la disolución. La intensidad de corriente también está constituida por diferentes aportes que son:

Ecuación 2.7

$$i_{medida} = i_{cap} + i_{far}$$

$$i_{far} = i_{difusión} + i_{migración\ iónica} + i_{convectiva}$$

Donde:

- i_{cap} = corriente capacitiva que aparece al formarse la doble capa eléctrica.
- i_{far} = corriente faradéica o de electrólisis, la cual es un indicativo de la velocidad de la reacción electroquímica. Ésta es el resultado de la contribución de tres fenómenos que conforman el transporte de masa.

La velocidad de reacción, y por lo tanto la corriente de electrólisis, depende de la forma en la que la especie llega al electrodo, de la velocidad de transferencia electrónica, de las reacciones químicas acopladas que ocurren antes o después de la reacción electroquímica, de fenómenos de adsorción en la superficie del electrodo, que bien puede ser del medio de reacción o del compuesto estudiado.

2.2.8 Consideraciones sobre la cinética de transferencia de masa

- Difusión: es el movimiento espontáneo debido a un gradiente de concentración, la materia fluye de una región concentrada hacia otra de menor concentración para finalizar en un estado homogéneo.
- Migración: las especies con carga eléctrica son transportadas a través de un campo eléctrico, el cual se forma al imponer una diferencia de potencial.
- Convección: el transporte de materia se realiza por medios físicos, al agitar una disolución, al girar o vibrar el electrodo de trabajo, etc.

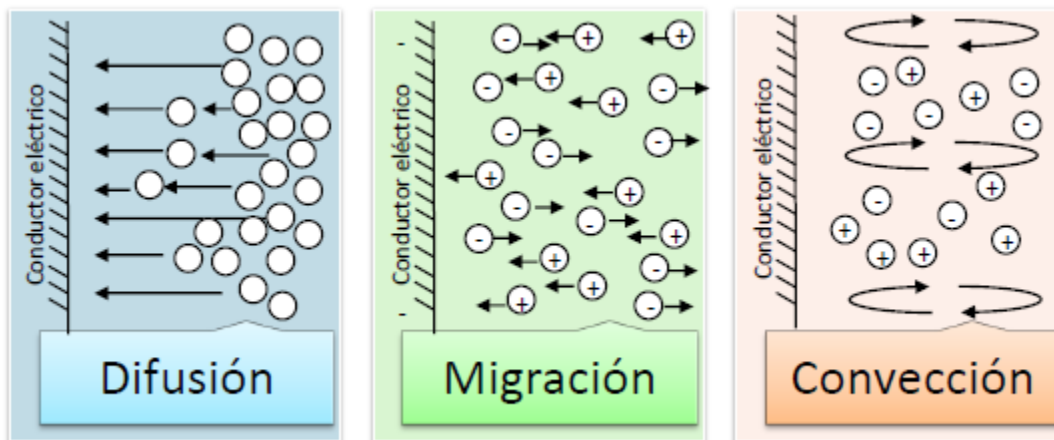


Figura 2.9 Representación de los distintos mecanismos de transporte de masa al electrodo.

Todos estos términos están involucrados en la ecuación de Nernst-Planck (Bard 2000).

Ecuación 2.8

$$J(x,t) = -D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} - \left(\frac{zFC}{RT} \right) \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + C(x,t)V(x,t)$$

En la Ecuación 2.8 el flujo de materia ($J(x,t)$ [$\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) está formado por los diferentes aportes, en primer lugar está el término de transporte por difusión donde $\partial C(x,t)/\partial x$ es el gradiente de concentración a la distancia x y al tiempo t . En segundo lugar se tiene el aporte del transporte por migración debido al campo eléctrico, z y C son la carga y la concentración de la especie respectivamente y $\partial \phi(x,t)/\partial x$ es el gradiente de potencial. Por último se tiene la contribución convectiva, donde $V(x,t)$ es la velocidad hidrodinámica en la dirección x . De las demás constantes que aparecen, F es la constante de Faraday, D es el coeficiente de difusión de la especie, R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura.

Debido a que la corriente eléctrica es proporcional al flujo de materia (J) que llega al electrodo para efectuar una reacción electroquímica, la corriente que se registra estará en función de los aportes de difusión, migración y convección, como se describe en la Ecuación 2.9.

Ecuación 2.9

$$i = -nFAJ(x, t)$$

Donde:

A = área del electrodo [cm^2].

n = número de electrones intercambiados

Para relacionar el valor de corriente con la concentración del analito o del compuesto de interés, se pueden realizar manipulaciones experimentales a fin de controlar o hacer muy pequeño el transporte por migración (agregando sales iónicas concentradas) y por convección (utilizando una disolución sin agitar o bien, agitando constante y controladamente). Bajo estas condiciones el flujo de materia, descrito por la Ecuación 2.8, estará determinado únicamente por difusión.

Ecuación 2.10

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$$

En conclusión, sustituyendo la Ecuación 2.10 en la Ecuación 2.9, se llega a una nueva función, en la que la corriente registrada estará determinada por la difusión de la especie y será proporcional al gradiente de concentración de la especie electroactiva.

Ecuación 2.11

$$i = nFAD \frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$$

El coeficiente de difusión está comprometido con la viscosidad del medio (η), con la temperatura y con el radio de la partícula en movimiento (considerándola esférica, r) por medio de la ecuación de Einstein–Stokes.

Ecuación 2.12

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Donde $k_B = 1.380 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ y se denomina como la constante de Boltzman.

2.2.9 Consideraciones sobre la cinética de transferencia de carga

El transporte de carga es el otro proceso de la reacción al electrodo que incluye la etapa en la que la carga pasa a través de la interfase. Su velocidad para una reducción (Ecuación 2.13) y para una oxidación (Ecuación 2.14) se muestran a continuación:

Ecuación 2.13

$$v_{Red} = k^0 e^{\left(\frac{\alpha n F}{RT}(E-E^0)\right)} C_{Ox}^S$$

Ecuación 2.14

$$v_{Ox} = k^0 e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)\right)} C_{Red}^S$$

Donde:

k^0 = constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones

n = número de electrones transferidos

T = temperatura (K)

F = constante de Faraday, $F=96485.34$ ($C\ mol^{-1}$)

E^0 = potencial normal de la especie (V)

E = potencial aplicado (V)

α = coeficiente de transferencia de electrones

C_{Ox}^S = concentración del oxidante en la superficie del electrodo

C_{Red}^S = concentración del reductor en la superficie del electrodo

Para conocer la corriente total se tienen que tomar las contribuciones de corriente catódica y anódica mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2.15

$$I_{Total} = nFAk^0 (v_{Red} - v_{Ox})$$

De la ecuación 2.15 se puede obtener finalmente una relación de i - E ; sin embargo, desde un punto de vista cinético para una reacción de transferencia de n electrones se tiene la ecuación de Eyring:

Ecuación 2.16

$$I_{Total} = nFAk^0 \left\{ C_{Ox} \left[e^{\left(\frac{\alpha n F}{RT}(E-E^0)\right)} \right] - C_{Red} \left[e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)\right)} \right] \right\}$$

Si se tienen condiciones de equilibrio la intensidad de corriente total es cero, pues la velocidad de reducción se iguala a la velocidad de oxidación, consecuentemente al despejar E , que será el potencial en condiciones de equilibrio (E_{eq}), se obtiene:

Ecuación 2.17

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \right)$$

La Ecuación 2.17 es la ecuación de Nernst y es válida sólo en condiciones de equilibrio, esto es, cuando $I_{Total} = 0$.

Si se despeja E^0 de la Ecuación 2.17 y se sustituye en la ecuación de Eyring (Ecuación 2.16) se puede obtener lo siguiente sustituyendo el término respectivo a la sobretensión (Ecuación 2.5):

Ecuación 2.18

$$I = I_0 \left[e^{\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta \right)} - e^{\left(\frac{(1-\alpha) n F}{RT} \eta \right)} \right]$$

La relación anterior toma el nombre de ecuación de Butler - Volmer que describe la relación $i-E$ para reacciones controladas por la velocidad de transferencia de carga. El valor de I_0 es la corriente de intercambio la cual se presenta cuando $E_{eq} = E^0$ para una señal de corriente, sea anódica o catódica.

Ecuación 2.19

$$I_0 = nFAk^0 (C_{Ox}^S)^{1-\alpha} (C_{Red}^S)^\alpha$$

Como se observa en la figura 2.10, para valores de $\eta = 0$, el valor de la corriente total es cero cuando la concentración del oxidante es igual a la del reductor, en este caso se habla de que las corrientes anódica (de oxidación) y catódica (de reducción) son iguales. Cuando las concentraciones del oxidante y del reductor son diferentes, la intensidad de corriente, en $\eta = 0$, tendrá un valor de $I=I_0$ y en condiciones de equilibrio, el potencial E_{eq} , dependerá de las concentraciones de C_{Ox} y de C_{Red} descritas por la ecuación de Nernst.

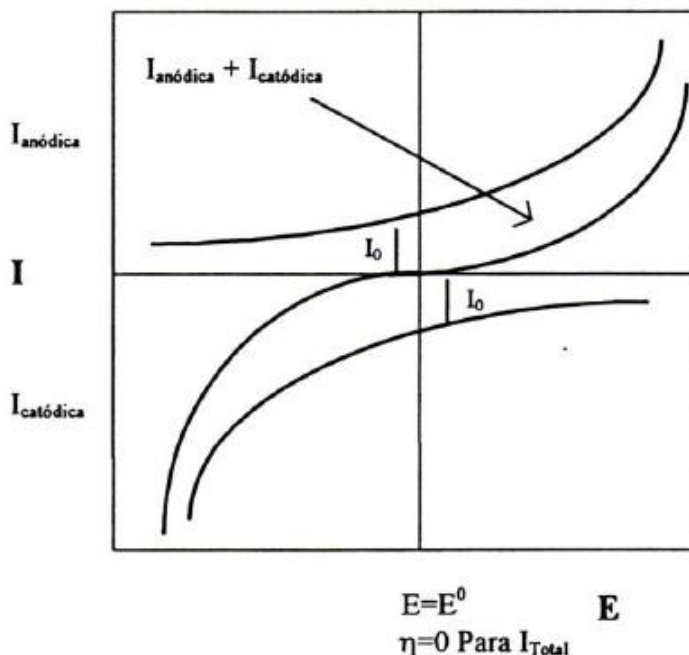


Figura 2.10 Relación de i - E desde un punto de vista cinético para una reacción de transferencia de electrones.

2.2.10 Reversibilidad e Irreversibilidad

La reversibilidad termodinámica es aquel cambio que puede invertirse (producir un cambio de dirección) por medio de una modificación infinitesimal de signo contrario. Si el sistema no regresa a su estado original entonces se habla de un proceso irreversible. Este concepto también se aplica al caso de una reacción electroquímica, que se ve reflejada en la forma de las curvas i - E , puesto que la forma ideal se encuentra en el caso reversible, las especies intercambian los electrones rápidamente, el comportamiento cinético está gobernado por movimiento de los iones hacia el electrodo (control del transporte, por ejemplo, difusión) y no aparecen parámetros cinéticos de la reacción de transferencia de carga al electrodo en el paso determinante de la reacción. Cuando el control cinético depende del proceso de transferencia de carga (la velocidad de transferencia de carga es más lenta que la velocidad de transporte de masa, por ejemplo, difusión) se dice que el proceso es irreversible y no se podrá regresar a las condiciones anteriores al invertir el sentido de la perturbación (figura 2.11, derecha).

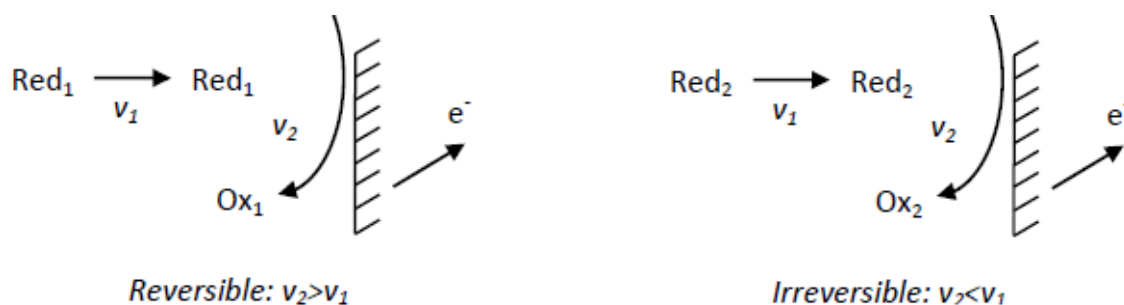
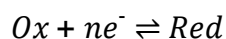


Figura 2.11 Representación esquemática de un proceso reversible (izquierda) y uno irreversible (derecha) al electrodo.

Si un sistema electroquímico sigue el comportamiento de la ecuación de Nernst o una ecuación derivada de ella, se dice que la reacción electroquímica es reversible (o nernstiana).

Ecuación 2.20



Readaptando:

Ecuación 2.21

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right)$$

Sin embargo, un proceso puede parecer reversible o irreversible dependiendo de qué tan rápido se puedan detectar los procesos, se haga la perturbación y se restablezca el equilibrio.

2.3 Técnicas electroanalíticas

2.3.1 Programas de perturbación transitorios

De acuerdo con el tipo de perturbación que se imponga será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá el tipo de información que se obtendrá para caracterizar a las moléculas, las reacciones al electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación. Si se impone una

diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor – disolución. Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo con la manera en que realizan mediciones y la perturbación del sistema de acuerdo al siguiente diagrama (Baeza & García 2011), tal como se muestra en la figura 2.12.

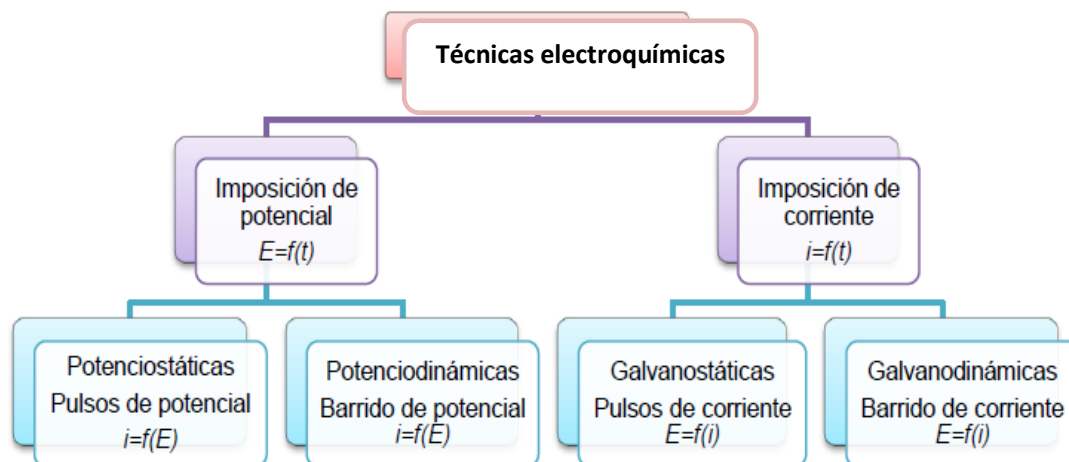


Figura 2.12 Clasificación de técnicas electroquímicas transitorias.

- Para que se lleve a cabo una reacción electroquímica debe provocarse una perturbación y generarse una respuesta de donde se puede obtener información que permitirá caracterizarla. Se tienen varios tipos de perturbación de acuerdo con la clasificación mostrada en la figura 2.12.
- Por imposición de un pulso constante de potencial (cronoamperometría): Se impone una diferencia de potencial mediante un potenciostato y se registra la corriente obtenida en función del tiempo, manteniendo condiciones en estado estacionario (sin agitar). El transporte de masa en estas condiciones está regido por difusión y la curva $i - t$ refleja la disminución de la concentración del analito en las cercanías del electrodo.
- Por imposición de una corriente constante (cronopotenciometría): Se obtiene como respuesta un cambio en la diferencia de potencial, el cual cambia hacia valores de potencial característicos del par redox, la concentración de la especie varía conforme ocurre la transferencia de electrones (reacción electroquímica) necesaria para mantener la intensidad de corriente constante hasta que la especie se acaba en las cercanías del electrodo, es entonces cuando el potencial cambia hacia valores en que otra especie pueda aportar los electrones para seguir manteniendo la corriente constante.

- Técnicas que involucran la variación lineal de potencial con el tiempo (dE/dt). Este tipo de técnicas utilizan un barrido de potencial que presenta velocidad constante (también se puede realizar un barrido de corriente). Una de las técnicas más difundidas por la información que puede aportar sobre los mecanismos de reacción de especies electroactivas es la voltamperometría; la cual se puede realizar en régimen de difusión pura (sin agitar) o bien en régimen de difusión convectiva (se hace al girar el ET, o manteniendo el goteo de mercurio constante), donde se encuentra clasificada la polarografía.

La figura 2.13 muestra el programa de perturbación y la respuesta obtenida para cada técnica mencionada.

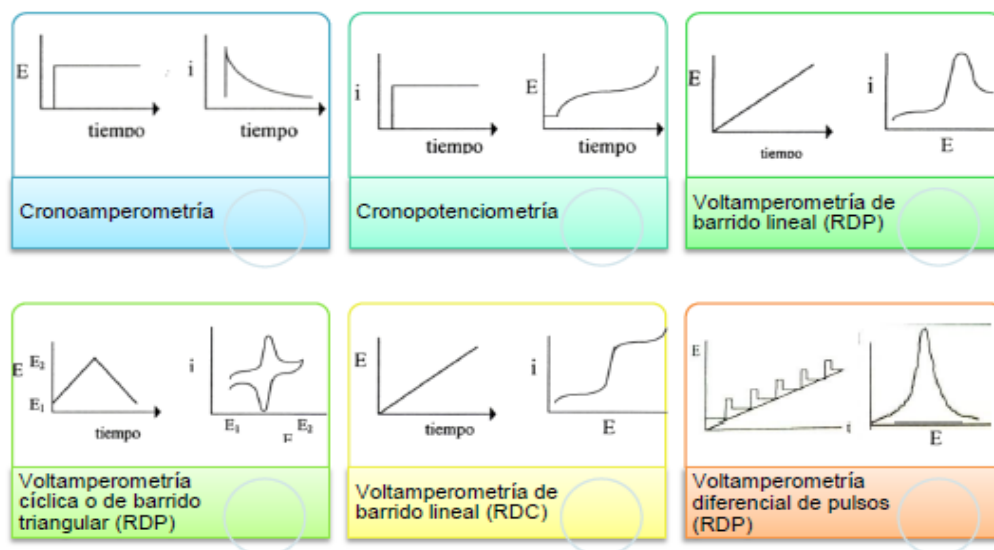


Figura 2.13 Diagramas de perturbación (izquierda) y patrones de respuesta típica obtenida de tales perturbaciones (derecha).

2.3.2 Voltamperometría cíclica

Una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción es la voltamperometría cíclica, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos. Como se muestra en la figura 2.14, la señal es de tipo triangular, es decir, a un número n de ciclos, sobre un electrodo estacionario, estático y en régimen de difusión pura (sin agitar).

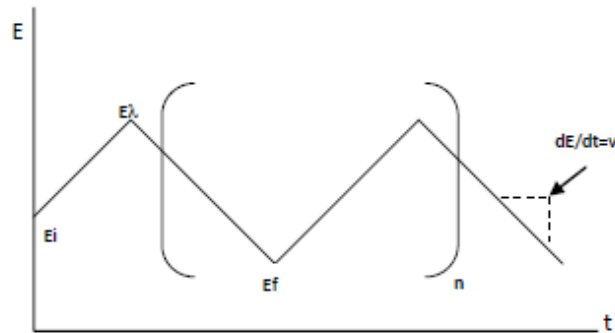


Figura 2.14 Programa de perturbación para voltamperometría de barrido triangular a n ciclos.

El ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que acontece el cambio de la dirección de barrido reciben el nombre de potenciales de inversión (E_{λ}). Los intervalos de potencial se escogen teniendo en cuenta los valores en los que se produce la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios analitos. La respuesta consecuente se llama voltamperograma cíclico y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado, en una curva del tiempo $E=f(i)$. En la figura 2.15 se muestra un ejemplo de voltamperograma donde se señalan las magnitudes físicas de este patrón de respuesta, en el ejemplo, una electrooxidación.

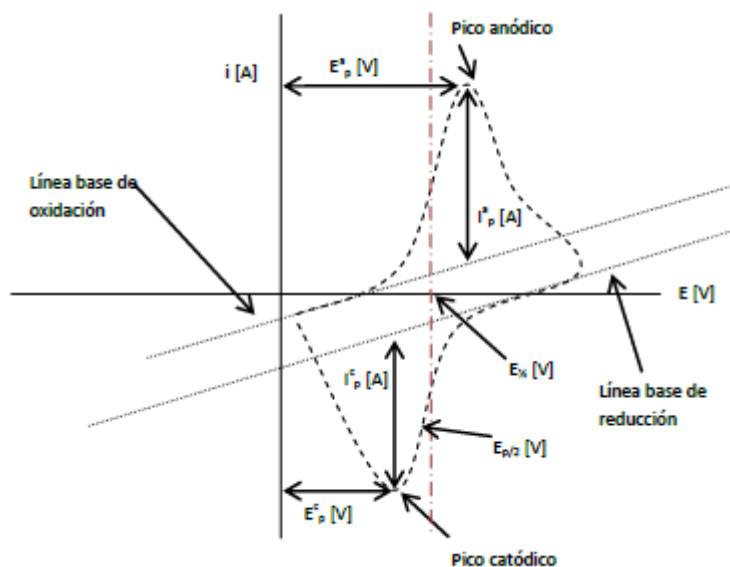


Figura 2.15 Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo con el convenio planteado por la IUPAC⁽¹⁵⁾.

Esta técnica permite electrolizar una especie e invertir el potencial para comprobar la formación de su par redox, de esta forma es posible dilucidar mecanismos de reacción. Al variar la velocidad de barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en procesos redox. Si se analiza una muestra con dos o más analitos presentes, su comportamiento es particular, por lo que el voltamperograma resultante no es necesariamente la suma de los voltamperogramas individuales de cada analito.

En la figura 2.15 se muestran los parámetros de un voltamperograma cíclico, donde:

- E_p^c = potencial de pico catódico
- E_p^a = potencial de pico anódico
- i_p^c = intensidad de corriente de pico catódico
- i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico

La figura 2.16 muestra dos voltamperogramas típicos de medio acuoso y medio no acuoso, para sistemas comunes al par redox $Fe^{(II)}/Fe^{(III)}$.

Consideremos el ejemplo de la izquierda, la reducción de $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ a $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$. Primero se realiza el barrido de potencial desde un valor en donde no ocurre la electrólisis (punto A) y se llega a un valor en el que ocurre la electrólisis (punto B), la corriente ($i_{catódica}$) crece exponencialmente en este punto (punto C). Conforme se sigue realizando el barrido de potencial la concentración de la especie en disolución disminuye cerca de la superficie del electrodo y como se realiza en condiciones de difusión pura, el aporte de masa por medio de difusión no alcanza a mantener una concentración en estado estacionario en la región cercana al electrodo porque la reacción de transferencia de electrones es mucho más rápida que la velocidad de difusión y esta última es el paso determinante, por lo tanto la concentración de $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ se agota y es cuando la corriente llega a un máximo (punto D). Posteriormente, al pasar el máximo se sigue realizando el barrido de potencial, ahora en condiciones limitadas por difusión, la corriente disminuye debido a que no hay más compuesto que pueda llegar a la superficie del electrodo, en este punto la corriente es proporcional a t .

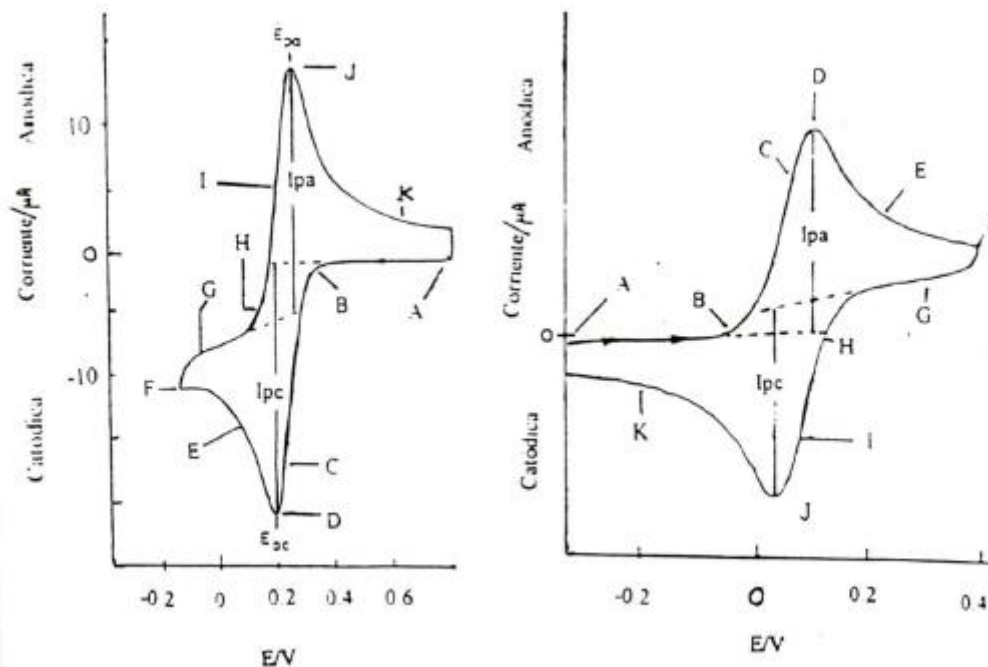


Figura 2.16 Izquierda: Voltamperograma cíclico de la reducción de $[Fe^{II}(CN)_6^{4-}]$, en medio acuoso a partir de una disolución de $K_4Fe^{II}(CN)_6$ 6 mmol L^{-1} en KNO_3 1 mol L^{-1} . E vs ECS, 50 mV s^{-1} ⁽¹⁶⁾. Derecha: Voltamperograma cíclico de la oxidación de ferroceno, Fc 1 mmol L^{-1} en TBAP 0.1 mol L^{-1} , en AN. E vs Ag^0/Ag^+ , 250 mV s^{-1} . Se utiliza ET de Pt^0 en ambos casos.

La ventaja de la voltamperometría cíclica es el hecho de que se genera una cantidad significativa del producto cerca del electrodo al hacer el barrido de potencial de E_1 a E_2 . Cuando el barrido de potencial se invierte de E_2 a E_1 (punto F) la corriente sigue siendo catódica (punto G) porque está en valores en donde aún puede reducir a $Fe^{(III)}$, posteriormente se llega a valores en donde comienza la oxidación de $[Fe^{II}(CN)_6^{4-}]$ (punto H a punto I), produciendo el compuesto inicial. La corriente se registra hasta que también llega a un máximo (punto J) y la corriente disminuye (punto K) conforme la cantidad de $Fe^{(II)}$ disminuye cerca del electrodo.

Un análisis sistemático permite explicar el ejemplo de la de la figura 2.16 en medio no acuoso (derecha), la oxidación de ferroceno a ferricinio, toda vez que se trata de un sistema reversible.

2.3.3 Ecuaciones básicas en voltamperometría cíclica

La ecuación de Randles – Sevcik establece una proporcionalidad entre el perfil de la corriente obtenida del barrido del primer ciclo y la intensidad de corriente, concentración y velocidad de barrido (Baeza & García, 2011):

Ecuación 2.22

$$i_p = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

Ecuación 2.23

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (\text{a } 25^\circ\text{C})$$

Donde:

- i_p = intensidad de corriente de pico [A]
- n = número de electrones transferidos
- A = área superficial del electrodo [cm^2]
- D = coeficiente de difusión de la especie electroactiva [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
- C = concentración de la especie electroactiva [mol cm^{-3}]
- v = velocidad de barrido [V s^{-1}]

Para un sistema reversible la gráfica de $i_p = f v^{1/2}$ presenta el perfil de una línea recta, cuya pendiente permite extraer información analítica importante, como el número de electrones intercambiados o el valor del coeficiente de difusión de la especie electroactiva. Cuanto más rápida es la velocidad de barrido, mayor es la intensidad de corriente de pico, mientras el sistema continúe siendo reversible; sin embargo, si la especie electroactiva se está adsorbiendo en las inmediaciones del electrodo, la intensidad de corriente de pico es directamente proporcional a la velocidad de barrido en lugar de su raíz cuadrada. Para especies irreversibles la ecuación de Randles – Sevcik se modifica debido a la corrección de términos cinéticos.

Ecuación 2.24

$$i_p = (2.99 \times 10^5) \alpha^{1/2} n A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (\text{a } 25^\circ\text{C})$$

Un criterio temprano para identificar la reversibilidad de un sistema consiste en realizar el cociente de las señales de corriente anódica y catódica para diversas concentraciones o diversas velocidades de barrido. Debe cumplirse que $i_p^a / i_p^c = 1$ para una electroreducción y $i_p^c / i_p^a = 1$ para una electrooxidación, donde la

corriente debida a la especie que se genera al electrodo se coloca en el numerador del cociente.

El potencial de media onda ($E_{1/2}$) se aproxima al valor del potencial normal condicional ($E^{0'}$) para un sistema reversible, de acuerdo con la siguiente relación:

Ecuación 2.25

$$E^{0'} \cong E_{1/2} = \frac{(E_p^c + E_p^a)}{2}$$

La ecuación anterior se cumple, toda vez que los coeficientes de difusión de ambas especies sean próximos y eliminen el término logarítmico de la ecuación siguiente:

Ecuación 2.26

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{Red}^{1/2}}{D_{Ox}^{1/2}} \right)$$

Los sistemas reversibles que son lo suficientemente rápidos como para mantener las concentraciones de reactivo y producto en la superficie del electrodo muestran un comportamiento típico, pues el potencial donde se manifiestan los picos anódico y catódico presentan una diferencia constante ⁽¹⁷⁾.

Ecuación 2.27

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{2.22RT}{nF} = \frac{57.0 \text{ mV}}{n} \quad (\text{a } 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

Los argumentos anteriores permiten calcular el término voltamperométrico $E_{p/2}$ (potencial de medio pico) para un sistema reversible, que indica una mejor estimación del punto medio entre los picos de un voltamperograma (el valor de potencial correspondiente para $i_{p/2}$). En la Ecuación 2.23 el signo positivo se toma para un proceso de oxidación, mientras que el signo negativo para una reducción.

Ecuación 2.28

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm 1.09 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} \pm \frac{28.0 \text{ mV}}{n} \quad (\text{a } 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

Para un sistema reversible E_p es independiente de la velocidad de barrido.

Por otro lado, los sistemas irreversibles dependen de la velocidad de barrido. La siguiente relación es importante pues involucra estos dos términos, E^0 y $v^{(18)}$.

Ecuación 2.29

$$E_p^c = E^0 - \frac{RT}{\alpha n} \left[0.780 + \ln \left(\frac{D^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left(\frac{\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right]$$

Las variables descritas en la Ecuación 2.28 ya han sido definidas. Para un sistema electroquímico irreversible la gráfica de $E_p = f \ln v$, para el pico anódico o catódico, genera una línea recta cuya ordenada al origen se ajusta a E^0 . La recta presenta una pendiente de $1.15RT/\alpha n$ o $30 \text{ mV}/\alpha n$ a 25°C por cada incremento de 10 en la velocidad de barrido. En estos casos el potencial de pico es una variable que no depende de la concentración del analito. Para definir el E_p^a , la función anterior toma los mismos términos, pero los sumandos cambian de signo (a excepción del E^0).

Un criterio rápido para determinar α se basa en la diferencia entre el potencial de pico (E_p) y el potencial a la mitad de la altura de pico ($E_{p/2}$).

Ecuación 2.30

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{1.857RT}{\alpha nF} = \frac{47.7 \text{ mV}}{\alpha n} \quad (\text{a } 25^\circ\text{C})$$

Existen tratamientos formales para el análisis de las curvas $i-E$ para sistemas irreversibles; sin embargo, los reportes presentan tratamientos de datos inconvenientes y tediosos ⁽¹⁹⁾

Finalmente, existen dos funciones (para electrorreducción y electrooxidación respectivamente) que permiten evaluar la constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones, k^0 , a partir de una combinación entre la corriente de pico y el potencial normal condicional redox según la aproximación de Butler –Volmer:

Ecuación 2.31

$$i_p^a = 0.227nFAC_{Ox}k^0e^{-\alpha n f (E_p - E^0)}$$

Ecuación 2.32

$$i_p^c = 0.227nFAC_{Red}k^0e^{(1-\alpha)n f (E_p - E^0)}$$

Donde $f = F/RT$ en unidades de $[V^{-1}]$. Una gráfica de $\ln i_p = f(E_p - E^0)$ determinada a diferentes velocidades de barrido, debe producir una línea recta con pendiente $-\alpha n f$ y una intercepción proporcional a k^0 .

2.3.4 Criterios de reversibilidad, irreversibilidad y cuasirreversibilidad

Matsuda y Ayabe⁽²⁰⁾ acuñaron el término cuasirreversible para las reacciones que muestran limitaciones cinéticas de electrotransferencia, donde la reacción inversa debe ser considerada. Éste es el primer tratamiento de dichos sistemas para un solo paso mono electrónico.

Se define el parámetro Λ (de carácter adimensional) que define la forma del pico y de varios parámetros de pico.

Ecuación 2.33

$$\Lambda = \frac{k^{\circ}}{(D_{Ox}^{1-\alpha} D_{Red}^{\alpha} f v)^{1/2}}$$

Ecuación 2.34

$$\Lambda = \frac{k^{\circ}}{(D f v)^{1/2}}$$

Los autores proponen las siguientes zonas límite para voltamperometría de barrido lineal.

Tabla 2.1 Criterios de reversibilidad para sistemas electroquímicos, según Matsuday y Ayabe.

Cualidad del sistema	Criterio sobre Λ	Criterio sobre k°
Reversible	$\Lambda \geq 15$	$k^{\circ} [cm s^{-1}] \geq 0.3 v^{1/2}$
Cuasirreversible	$15 \geq \Lambda \geq 10^{-2(1+\alpha)}$	$0.3 v^{1/2} \geq k^{\circ} [cm s^{-1}] \geq 2 \times 10^{-5} v^{1/2}$
Totalmente irreversible	$\Lambda \leq 10^{-2(1+\alpha)}$	$k^{\circ} [cm s^{-1}] \leq 2 \times 10^{-5} v^{1/2}$

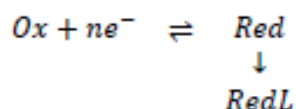
De esta manera, un sistema puede mostrar un comportamiento reversible, cuasireversible o totalmente irreversible dependiendo del valor de Λ o, experimentalmente, de la velocidad de barrido empleada. La aparición de efectos cinéticos depende del tiempo ventana del experimento, que es esencialmente el tiempo necesario para recorrer la onda de voltamperometría de barrido lineal. A velocidades de barrido pequeñas (o tiempos largos) los sistemas muestran ondas

reversibles; mientras que a grandes velocidades de barrido (o tiempos cortos) es observado un comportamiento totalmente irreversible.

2.3.5 Reacciones químicas acopladas y mecanismos de reacción en voltamperometría cíclica

Una reacción química acoplada es una reacción química en la que uno de los pares redox participa en el proceso global que acompañan a un proceso electroquímico.

Ecuación 2.35



En la Ecuación 2.35 se ilustra una reacción electroquímica reversible que aparece con un equilibrio de una reacción química acoplada irreversible donde *Red* reacciona con *L* (Mecanismo Electroquímico reversible – Químico irreversible, ErCi). En la literatura se pueden encontrar ejemplos que muestran las aplicaciones de la voltamperometría cíclica en el estudio de mecanismos de reacción, así como los perfiles ocasionados por las reacciones químicas acopladas.

En la figura 2.17a se presenta el voltamperograma de un sistema reversible, donde la intensidad de picos $i_p^a/i_p^c = 1$, independientemente de la velocidad de barrido de potencial. El voltamperograma de la figura 2.17b muestra el perfil de una reacción química acoplada a la reacción electroquímica anterior. Se presenta la reducción de Ox al electrodo; sin embargo, al invertir el barrido de potencial no se observa señal alguna asociada, esto implica que algo le sucedió al producto, en efecto, éste reacciona con alguna especie presente en el medio por lo que el par redox ya no está presente. Así, al realizar el barrido de regreso al valor de potencial de inicio, no se observa señal alguna o se presenta muy separada de la primera señal ocasionando que el cociente $i_p^a/i_p^c < 1$. Para deducir el posible mecanismo asociado, se utiliza el cociente de intensidad de corrientes de pico.

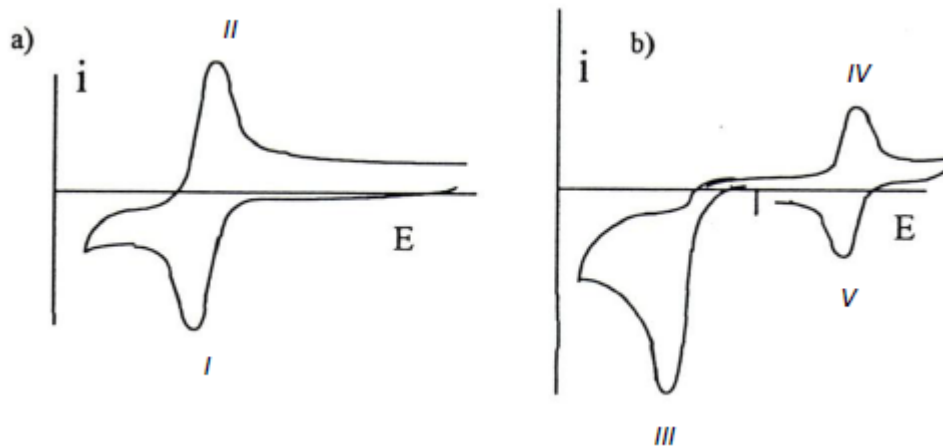
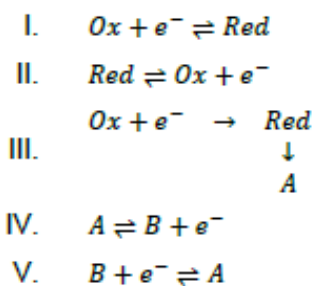


Figura 2.17 Voltamperograma de reducción de un compuesto Ox, **(a)** sin reacción química acoplada; **(b)** con reacción química acoplada.

Las reacciones que acontecen son:



La figura 2.17 muestra cómo la presencia de la reacción química acoplada modifica el voltamperograma de reducción. En conclusión, el producto A es electroactivo y presenta una señal reversible.

Se han reportado diversas funciones con una serie de variaciones típicas de que ayudan a determinar el tipo de mecanismo electroquímico que se presenta considerando las reacciones químicas acopladas que acontecen. Muchas de estas funciones se engloban en los denominados parámetros de Nicholson y Shain⁽²¹⁾⁽²²⁾. A continuación en la figura 2.18 se presentan los perfiles que puede adoptar la función ip^a / ip^c de acuerdo con el tipo de reacción química acoplada que interviene⁽²³⁾.

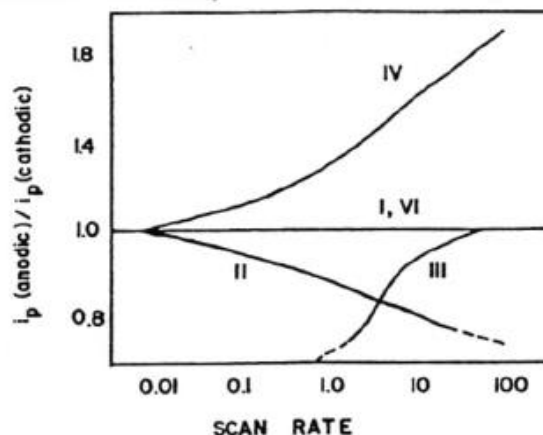


Figura 2.18 Cociente de corrientes de pico anódico a catódico como una función de la velocidad de barrido de potencial para varios mecanismos electroquímicos.

De manera complementaria, en la figura 2.19 se muestra la variación de la diferencia del cociente del potencial de medio pico entre la diferencia del logaritmo de la velocidad de barrido en función de la velocidad de barrido, permite determinar el tipo de mecanismo electroquímico que acontece. Este criterio es útil en los casos en que las reacciones químicas acopladas no permitan la identificación plena del pico, pero sí de $E_{p/2}$. El siguiente perfil toma en cuenta dos límites (superior e inferior) en función del número de electrones intercambiados por el sistema en estudio.

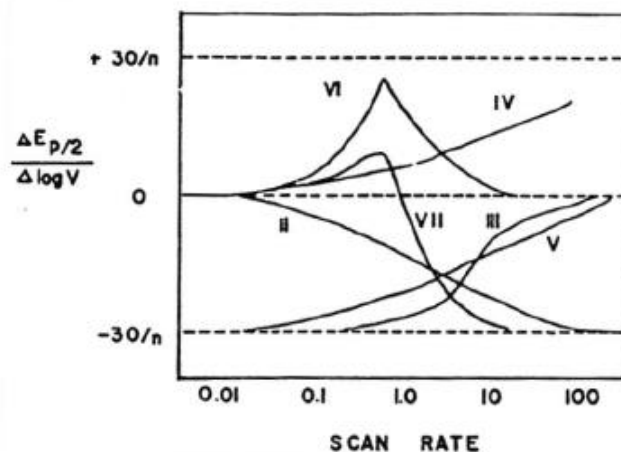


Figura 2.19 Velocidad de cambio de potencial como una función de la velocidad de barrido para varios mecanismos al electrodo.

Por otro lado, la función de corriente, $\Psi(E)$, es proporcional a la corriente de pico. Se expresa:

Ecuación 2.36

$$\Psi(E) = \frac{i_p}{FAD^{1/2}Cf^{1/2}v^{1/2}}$$

Donde i_p representa la corriente de pico observada y el denominador corresponde al valor de corriente al evaluar los parámetros marcados (los mismos que aparecen en la Ecuación 2.23). Experimentalmente la función de corriente es muy fácil de obtener, pues todos los parámetros son constantes para una especie electroactiva dada, en un medio definido, bajo el mismo electrodo y a la misma concentración, por lo que basta con representar $i_p/v^{1/2} = f(v)$. En la figura 2.20 se presenta el perfil de la función.

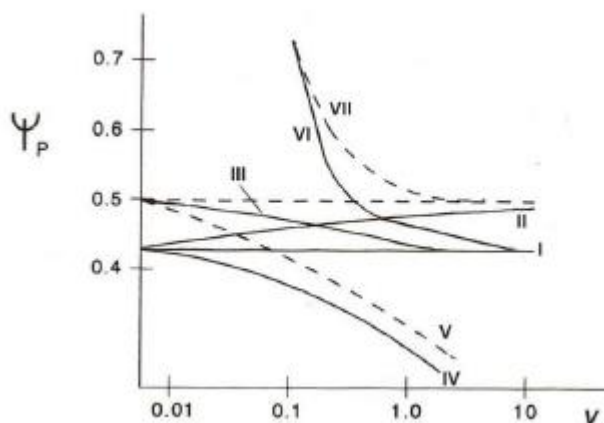
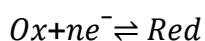


Figura 2.20 Influencia de la velocidad de barrido sobre la función de corriente para varios procesos electroquímicos con reacciones químicas acopladas.

Los mecanismos electroquímicos que involucran reacciones químicas acopladas de acuerdo con los perfiles anteriores (figura 2.18, figura 2.19 y figura 2.20) son:

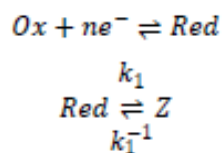
I Transferencia de electrón reversible sin complicaciones químicas. Mecanismo Er.

Ecuación 2.37



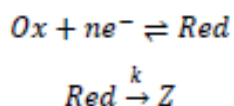
II Transferencia de electrón reversible seguida de una reacción química reversible.
Mecanismo ErCr.

Ecuación 2.38



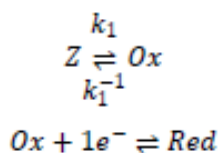
III Transferencia de electrón reversible seguida de una reacción química irreversible. Mecanismo ErCi.

Ecuación 2.39



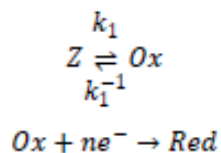
IV Reacción química reversible seguida de una transferencia de electrón reversible. Mecanismo CrEr.

Ecuación 2.40



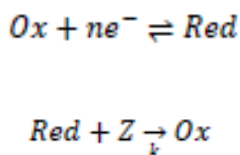
V Reacción química reversible seguida de una transferencia de electrón irreversible. Mecanismo CrEi

Ecuación 2.41



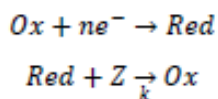
VI Transferencia de electrón reversible seguida por una regeneración irreversible del analito inicial. Regeneración catalítica.

Ecuación 2.42



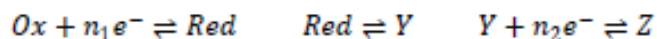
VII Transferencia de electrón irreversible seguida por una regeneración irreversible del analito inicial.

Ecuación 2.43



VIII Transferencia múltiple de electrones con intervención de reacciones químicas. Mecanismo ECE

Ecuación 2.44



Es importante señalar que las descripciones anteriores y los modelos presentados en este apartado son válidos para el proceso de reducción tal cual, y requieren una adecuación inversa para el proceso de oxidación.

2.3.6 Potenciometría de corriente nula ($i = 0$)

Se puede seguir el curso de una titulación por la observación del potencial de un electrodo indicador que percibe ya sea a la disolución o al reactivo. Debido a la forma logarítmica de la ecuación de Nernst, la curva de titulación tiene el perfil familiar de onda, correspondiendo el punto de inflexión en el punto final.

A menudo se pueden obtener titulaciones con pares de electrodos que la teoría termodinámica consideraría como ineficaces. Se tiene como ejemplo la combinación de electrodos de tungsteno y de platino. Ambos son “inertes” y deberían alcanzar el mismo potencial redox. Sin embargo, el equilibrio se alcanza con mayor lentitud en el tungsteno que en el platino, de manera que la respuesta se retrasa con respecto al otro. Este sistema muestra una ruptura súbita en el punto final, si se añade el reactivo a una tasa constante, como en un titulador automático o en un coulombímetro y se puede utilizar para titulaciones tanto redox como ácido base (Vassos 1987).

La instrumentación para la titulometría potenciométrica puede ser bastante sencilla, puesto que no se requieren potenciales exactos y sólo se desea observar el cambio abrupto en el punto final. Así que, se puede eliminar, sin error, la calibración de un pH metro con un amortiguador patrón. Dentro de la celda electroquímica sólo será necesario un electrodo indicador y un electrodo de referencia; así como un multímetro para determinar ΔE entre ambos electrodos durante el transcurso de la titulación.

Capítulo 3. Diseño Experimental

“La ignorancia afirma o niega rotundamente;

la ciencia duda”

Voltaire

*Escritor, poeta y pensador
(1694-1778).*

3.1 Materiales y Reactivos

A continuación se enlistan los reactivos utilizados durante el análisis.

- Hexacianoferrato de potasio (III). Marca: Merck. Pureza: 99.0 %.
- Hemoglobina liofilizada. Marca: Sigma-Aldrich. Pureza: 99.0 %.
- Trishidroxiamino metil metano. Marca: Merck. Pureza: 99.5 %.
- Agua destilada con una conductividad de $2 \mu\text{S cm}^{-1}$.
- Ácido clorhídrico concentrado. Marca: J. T. Baker. Pureza: 37.2 %
- Ácido nítrico concentrado. Marca: Merck Pureza: 70.0 %
- Alúmina de 5 micras de diámetro.
- Microelectrodo de platino de 0.035 cm^2 de área superficial.
- Barra de grafito de 7.5 cm de longitud.
- Una barra de plata de 9.5 cm de longitud.
- Una barra de plata de 2.0 cm de longitud
- Microelectrodo de platino de 0.0091 cm^2 de área superficial.
- Potenciómetro Oakton ®.

Para la preparación de las disoluciones de trabajo se empleó una Balanza analítica Sartorius ® BP210s. Para lograr una mayor homogenización de las disoluciones se utilizó un sonicador Sonic 310 Elma ®.

Para el ensayo por voltamperometría cíclica se utilizó un potenciostato Voltammograph CV-27. Los registros voltamperométricos se realizaron mediante un graficador Yokogawa ® modelo 3025.

El ensayo de potenciometría a corriente nula se utilizó un multímetro para el registro del potencial del electrodo de trabajo respecto al electrodo de referencia. Los registros de potencial en función del tiempo se obtuvieron mediante el software MUL – 600 versión 2.00.

3.2 Sistemas electroquímicos

Sistema A: En una celda electroquímica adaptada para tres electrodos se colocó el microelectrodo de platino cuya área superficial era de 0.035 cm^2 , como electrodo de trabajo; la barra de grafito como electrodo auxiliar y la barra de plata de 9.5 cm de longitud como electrodo de referencia (sin compartimentalizar). Tal como se muestra en la figura 3.1.

Sistema B: En una celda electroquímica adaptada para dos electrodos se colocó el microelectrodo de platino cuya área superficial era de 0.0091 cm^2 como electrodo de trabajo y la barra de plata de 2.0 cm de longitud como electrodo de referencia (compartimentalizado con buffer de TRIS y KNO_3 a pH 7.5). Tal como se muestra en la figura 3.2.

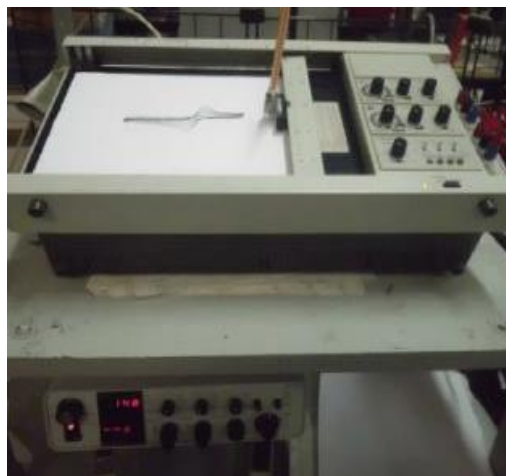
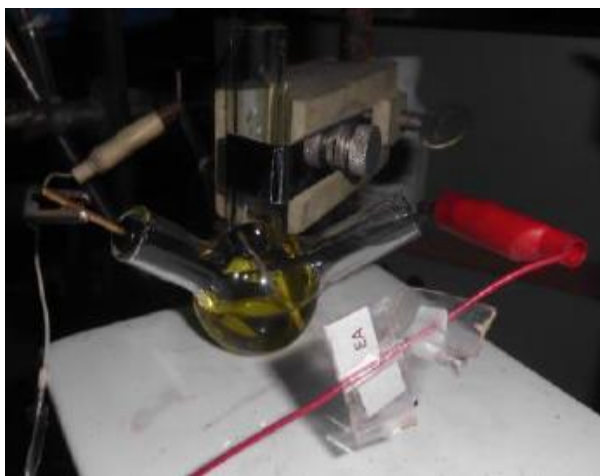


Figura 3.1 (Izquierda) Celda de trabajo de 3 electrodos para voltamperometría cíclica. (Derecha) Potenciostato y graficador analógico.

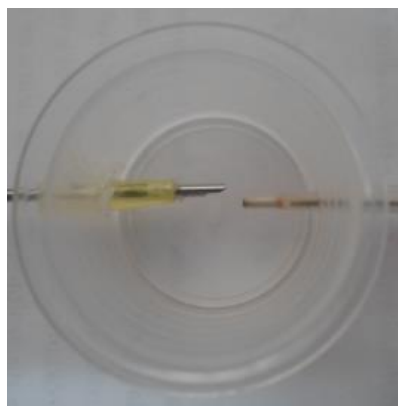


Figura 3.2 Celda de trabajo de 2 electrodos para potenciometría a corriente nula.

3.3 Metodología experimental

a) Voltamperometría cíclica a concentración y velocidad de barrido variables (en ausencia de Hb).

En la celda electroquímica del *sistema A* descrito en el apartado 3.2 se agregó 10 mL buffer (TRIS y KNO_3 ambos a una concentración de 0.1 M ajustado a $\text{pH} = 7.5$ con ácido clorhídrico concentrado) y se trazó un voltamperograma a 100 mV s^{-1} como blanco. Posteriormente se preparó 10 mL de disolución stock de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y se llevó al aforo con el mismo buffer (la concentración de esta disolución stock fue de 0.1 mol L^{-1}).

Se realizaron adiciones de $100 \mu\text{L}$ hasta un volumen final de $1000 \mu\text{L}$ del stock de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y entre cada adición se trazó el voltamperograma respectivo a 100 mV s^{-1} . A continuación, cuando el volumen adicionado de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ fue de $1000 \mu\text{L}$ se realizaron los voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido; es decir, a 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mV s^{-1} .

El programa de perturbación y las condiciones de captura fueron:

E_i : 0.62 V

E_λ : -0.70 V

Gain: 0.2 mA V^{-1}

Y range: 0.1 V cm^{-1}

X range: 0.1 V cm^{-1}

Con la ayuda de una hoja de cálculo se registraron los parámetros de cada voltamperograma procesado.

b) Voltamperometría cíclica a concentración y velocidad de barrido variables (en presencia de Hb).

En presencia de 1.0 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ se realizaron adiciones de $10 \mu\text{L}$ de Hb (0.05 g mL^{-1} utilizando buffer como medio de disolución). A partir de un volumen añadido de $100 \mu\text{L}$ Hb, las adiciones fueron en incrementos de $100 \mu\text{L}$ hasta $400 \mu\text{L}$. Entre cada adición se realizó los voltamperogramas respectivos.

Cuando las adiciones de Hb en la celda fueron de 100, 200, 300 y 400 μL se registraron los voltamperogramas respectivos a 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mV s^{-1} .

c) Caracterización por potenciometría a corriente nula.

En la celda electroquímica del *sistema B* descrito en el apartado 3.2 se agregó 1.0 mL buffer (TRIS y KNO_3 ambos a una concentración de 0.1 M ajustado a $\text{pH} = 7.5$ con ácido clorhídrico concentrado) y se trazó un blanco. Posteriormente se preparó 10 mL de disolución stock de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y se llevó al aforo con el mismo buffer (la concentración de esta disolución stock fue de 0.1 mol L^{-1}).

Se realizaron adiciones de 25 μL hasta un volumen final de 500 μL del stock de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y entre cada adición se trazó el potencial como una función del tiempo.

A continuación, cuando el volumen adicionado de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ fue de 500 μL se realizaron las adiciones de Hb (0.05 g mL^{-1}) de 25 μL hasta un volumen final de 1000 μL y entre cada adición se trazó el potencial como una función del tiempo.

Con la ayuda de una hoja de cálculo se registró el potencial como una función del volumen agregado a un tiempo de muestreo fijo; así como el potencial como una función de la concentración y logaritmo de la concentración de Hb.

Capítulo 4. Resultados y análisis

*“El cuerpo humano es el carruaje; el yo,
el hombre que lo conduce;
el pensamiento, son las riendas
y los sentimientos los caballos”*

*Platón
Filósofo griego
(427 a. C. – 347 a. C.)*

4.1 Parte I. Voltamperometría cíclica

4.1.1 Estudio voltamperométrico a diferente concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$ a velocidad de barrido fija (100 mV s^{-1})

Tras realizar los barridos electroquímicos de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 3 en ausencia de Hb se procedió a procesar los datos obtenidos. La Tabla 4.1 y la Tabla 4.2 muestran algunos parámetros electroquímicos obtenidos. En las figuras 4.1 y 4.2 se muestra la corriente de pico anódica y catódica en función de la concentración. De acuerdo con la Tabla 4.1 se puede notar que ΔE tiende a crecer y desviarse del valor teórico de 0.060 V ; esto quiere decir que como primer criterio, el sistema en ausencia de Hb a partir de datos de E no es posible determinar su reversibilidad. Otro parámetro para determinar la reversibilidad del sistema es evaluar el cociente de corrientes de pico anódico y catódico. El cual debe ser igual a 1 para un sistema reversible, En la Tabla 4.2 se aprecia que se cumple tal criterio. Es de notarse, que la electroreducción presenta una reversibilidad mayor con respecto a la electrooxidación.

Tabla 4.1 Valores de potencial de pico anódico y catódico en función del volumen añadido de hexacianoferrato de potasio (III) a 100 mV s^{-1} .

Volumen (μL)	Concentración (mol L^{-1})	Concentración (mol cm^{-3})	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	$E^\circ = E_{1/2}$ (V)	n
100	0.001	0.000001	0.3520	0.196	0.156	0.274	0.4
200	0.002	0.000002	0.3227	0.225	0.098	0.274	0.6
300	0.003	0.000003	0.3227	0.215	0.108	0.269	0.6
400	0.004	0.000004	0.2249	0.068	0.156	0.147	0.4
500	0.005	0.000005	0.3227	0.205	0.117	0.264	0.5
600	0.006	0.000006	0.3129	0.196	0.117	0.254	0.5
700	0.007	0.000007	0.3129	0.196	0.117	0.254	0.5
800	0.008	0.000008	0.3227	0.215	0.108	0.269	0.6
900	0.009	0.000009	0.3129	0.186	0.127	0.249	0.5
1000	0.01	0.00001	0.3129	0.196	0.117	0.254	0.5

Tabla 4.2 Intensidades de corriente de pico anódica y catódica en función del volumen añadido de hexacianoferrato de potasio (III) a 100 mv s⁻¹.

Volumen (μL)	Concentración (mol L ⁻¹)	Concentración (mol cm ⁻³)	I pico anódico (μA)	I pico catódico (μA)	I pico anódico (A)	I pico catódico (A)	I _{pa} /I _{pc}	I _{pc} /I _{pa}
100	0.001	0.000001	28.84	16.16	0.0000288	-0.0000162	1.785	0.560
200	0.002	0.000002	65.92	56.56	0.0000659	-0.0000566	1.165	0.858
300	0.003	0.000003	57.68	52.52	0.0000577	-0.0000525	1.098	0.911
400	0.004	0.000004	65.92	60.6	0.0000659	-0.0000606	1.088	0.919
500	0.005	0.000005	74.16	68.68	0.0000742	-0.0000687	1.080	0.926
600	0.006	0.000006	90.64	80.8	0.0000906	-0.0000808	1.122	0.891
700	0.007	0.000007	94.76	88.88	0.0000948	-0.0000889	1.066	0.938
800	0.008	0.000008	98.88	92.92	0.0000989	-0.0000929	1.064	0.940
900	0.009	0.000009	107.12	96.96	0.0001071	-0.0000970	1.105	0.905
1000	0.01	0.00001	115.36	109.08	0.0001154	-0.0001091	1.058	0.946

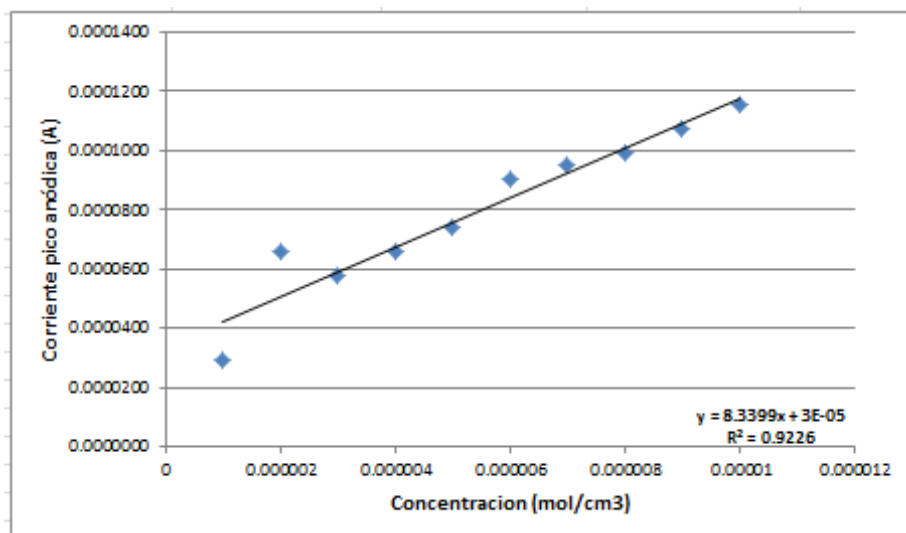


Figura 4.1 Corriente de pico anódica en función de la concentración añadida de hexacianoferrato de potasio (III).

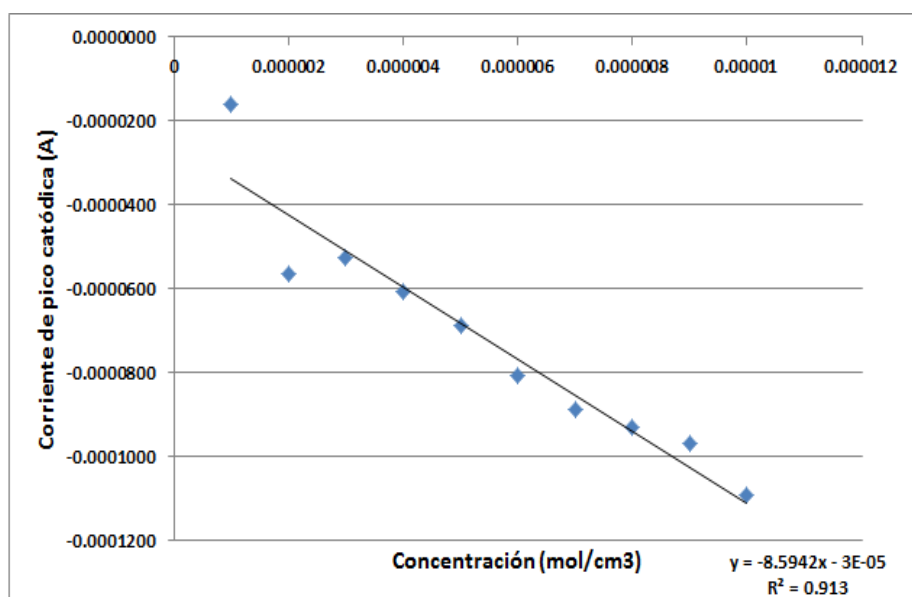


Figura 4.2 Corriente de pico catódica en función de la concentración añadida de hexacianoferrato de potasio (III).

A continuación la figura 4.3 muestra los registros voltamperométricos a diferentes concentraciones de hexacianoferrato de potasio (III) a una velocidad de barrido fija así como el dominio de electroactividad en ausencia del analito.

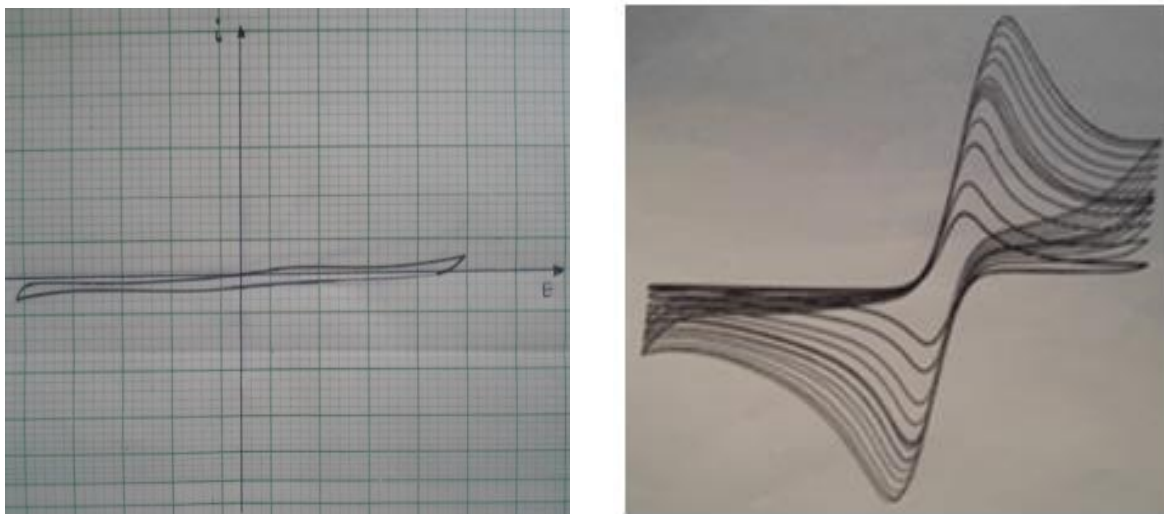


Figura 4.3 (Izquierda) Dominio de electroactividad establecido por el buffer. (Derecha). Voltamperogramas a diferentes concentraciones de $K_3[Fe(CN)_6]$. ET: Pt° , ER: Ag° , EA: Carbón. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} . Medio TRIS y KNO_3 a pH 7.5.

4.1.2 Estudio voltamperométrico a diferente velocidad de barrido a concentración fija de $K_3[Fe(CN)_6]$

Tal como se describió en el capítulo 4 se procedió a realizar barridos de potencial a diferentes velocidades; para lo cual, la celda contenía un volumen de $1000\ \mu\text{L}$ $K_3[Fe(CN)_6]$ equivalente a una concentración de 0.01 mol L^{-1} en presencia de los 10 mL de buffer (figura 4.4). A partir de los datos obtenidos que se muestran en la Tabla 4.3 y 4.4 se procedió a procesar la información para determinar la reversibilidad del sistema y poder determinar un mecanismo electroquímico en ausencia de Hb.

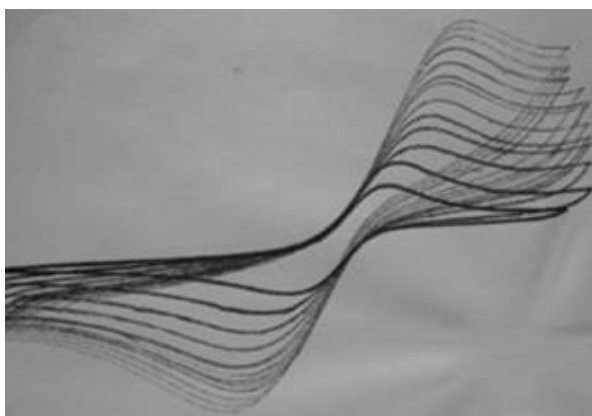


Figura 4.4 Voltamperogramas de $K_3[Fe(CN)_6]$ en medio amortiguado a diferentes velocidades de barrido.

La figura 4.4 muestra como a velocidades de barrido altas la reversibilidad del sistema se pierde, de hecho, se aprecia como la separación de picos de potencial es mayor conforme aumenta la velocidad.

Tabla 4.3 Valores de potencial de pico de $K_3[Fe(CN)_6]$ en medio amortiguado a diferentes velocidades de barrido.

vel ($mV s^{-1}$)	vel ($V s^{-1}$)	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	$E^\circ = E_{1/2}$ (V)	n
25	0.025	0.3031	0.215	0.088	0.259	0.682
50	0.05	0.3129	0.215	0.098	0.264	0.614
100	0.1	0.3227	0.196	0.127	0.259	0.472
150	0.15	0.3324	0.186	0.147	0.259	0.409
200	0.2	0.3324	0.176	0.156	0.254	0.384
250	0.25	0.3422	0.166	0.176	0.254	0.341
300	0.3	0.3618	0.166	0.196	0.264	0.307
350	0.35	0.3520	0.147	0.205	0.249	0.292
400	0.4	0.3716	0.147	0.225	0.259	0.267
450	0.45	0.4107	0.176	0.235	0.293	0.256
500	0.5	0.4009	0.147	0.254	0.274	0.236

Tabla 4.4 Valores de corriente de pico $K_3[Fe(CN)_6]$ en medio amortiguado a diferentes velocidades de barrido.

vel ($mV s^{-1}$)	vel ($V s^{-1}$)	I pico anódica (μA)	I pico catódica (μA)	I pico anódica (A)	I pico catódica (A)	I_{pa}/I_{pc}	I_{pc}/I_{pa}
25	0.0250	56.00	52.00	5.60E-05	-0.000052	1.077	0.929
50	0.0500	80.00	76.00	8.00E-05	-0.000076	1.053	0.950
100	0.1000	108.00	108.00	1.08E-04	-0.000108	1.000	1.000
150	0.1500	136.00	128.00	1.36E-04	-0.000128	1.063	0.941
200	0.2000	152.00	148.00	1.52E-04	-0.000148	1.027	0.974
250	0.2500	164.00	160.00	1.64E-04	-0.000160	1.025	0.976
300	0.3000	176.00	172.00	1.76E-04	-0.000172	1.023	0.977
350	0.3500	180.00	180.00	1.80E-04	-0.000180	1.000	1.000
400	0.4000	196.00	192.00	1.96E-04	-0.000192	1.021	0.980
450	0.4500	196.00	196.00	1.96E-04	-0.000196	1.000	1.000
500	0.5000	200.00	200.00	2.00E-04	-0.000200	1.000	1.000

Tal como se aprecia en la Tabla 4.3, no es posible decir que el sistema es reversible dado que la separación de potenciales de pico fue mayor a 0.060 V conforme aumenta la velocidad de barrido. Incluso el valor de n es de orden fraccionario lo cual implicaría que no existe una transferencia electrónica completa.

En la Tabla 4.4 se aprecia que el cociente de pico es prácticamente igual a 1 en el caso de una electroreducción, mostrando un mayor carácter reversible con respecto a la electrooxidación. Este criterio permite confirmar la reversibilidad del sistema a pesar de que dicha reversibilidad no se puede determinar a partir de datos de potencial. Por lo cual será conveniente que el mecanismo electroquímico se determine a partir de datos de corriente de pico.

A partir de los datos de la Tabla 4.3 y 4.4 se puede determinar si en el sistema bajo estudio, el transporte de masa está bajo un régimen de difusión pura para la respuesta obtenida de corriente de pico catódico y anódico. Para ello se grafica el cociente de la corriente de pico entre la velocidad de barrido elevado a la $\frac{1}{2}$ en función de la velocidad de barrido. Tal como se muestra en las figuras 4.5 y 4.6.

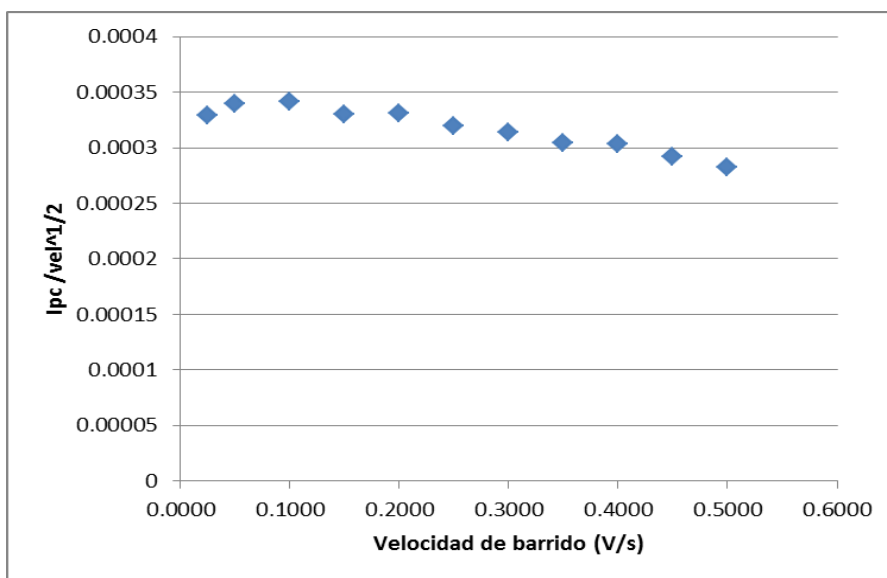


Figura 4.5 Evaluación del tipo de transporte de masa característico del sistema en ausencia de Hb para la corriente de pico catódica.

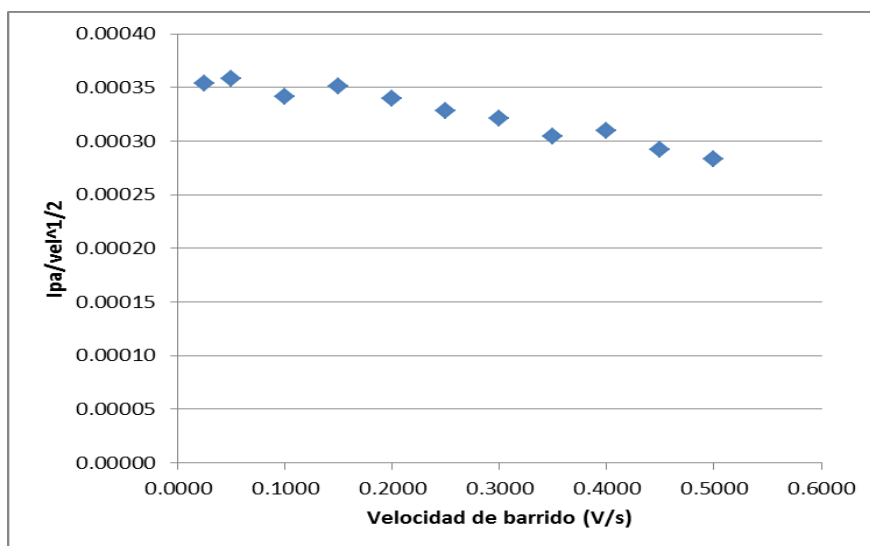


Figura 4.6 Evaluación del tipo de transporte de masa característico del sistema en ausencia de Hb para la corriente de pico anódica.

Tal como se aprecia en las figuras 4.5 y 4.6 se observa que en ausencia de Hb hay un indicio de que el transporte de masa del $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ y del $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ es difusional puro. Para lo cual se esperaría una línea recta de pendiente igual a cero. Sin embargo, se aprecia que existe una ligera desviación después de 200 mV s^{-1} . Esta desviación del comportamiento reversible podría deberse a diferentes causas: efectos capacitivos en la celda electroquímica, cinética lenta en la transferencia electrónica, presencia de efectos de superficie (adsorción).

Entre más sitios ocupados sobre la superficie del electrodo menos lugares disponibles habrá para la especie electroactiva que llegue del seno de la disolución provocando una disminución drástica de la corriente de pico. Este efecto se presentó a pesar de que el electrodo se limpió constantemente con ácido nítrico concentrado y alúmina entre cada barrido.

Una gráfica como las que se muestran en las figuras 4.7 y 4.8, confirman que el transporte de masa es de tipo difusional puro dado que es característico la obtención de una pendiente cercana o igual a 0.5.

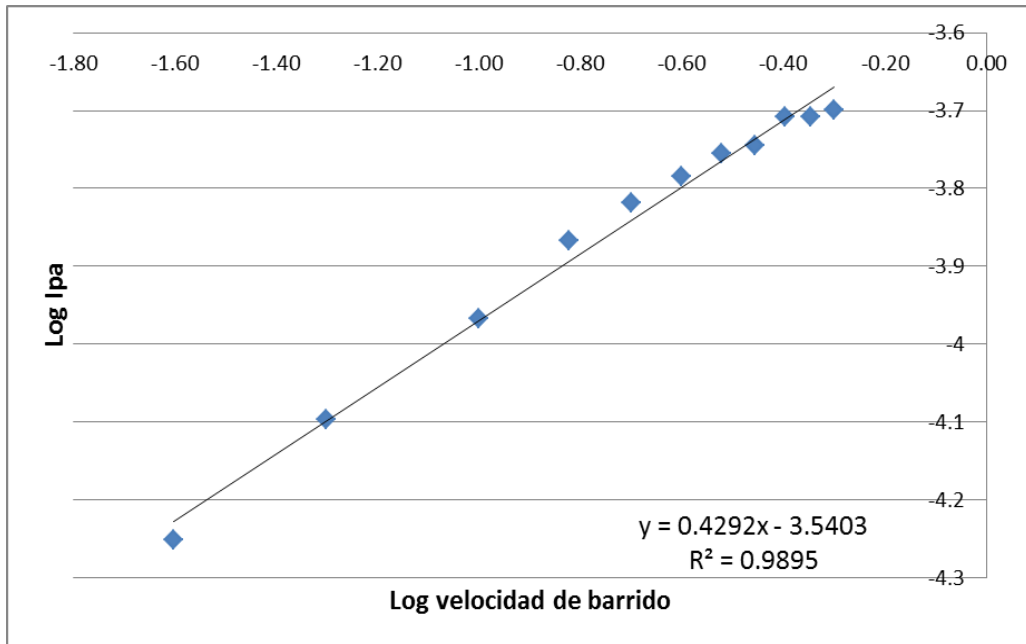


Figura 4.7 Logaritmo de la corriente de pico anódica en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

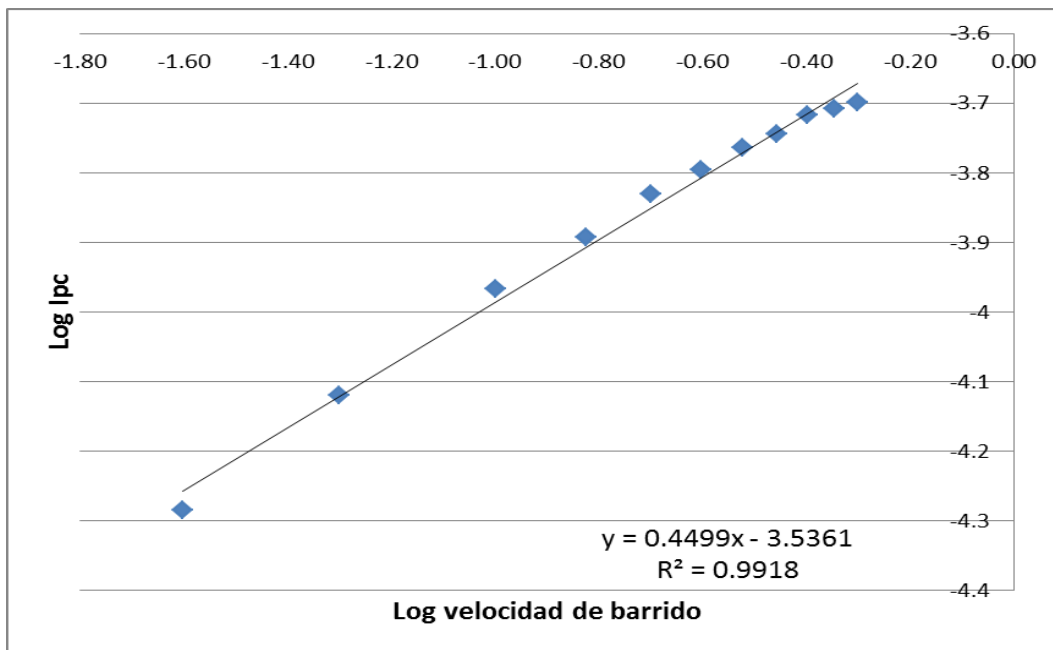


Figura 4.8 Logaritmo de la corriente de pico catódica en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

Tal como se muestra en las figuras 4.7 y 4.8 la pendiente es aproximada a un valor de 0.5 lo cual confirma que el sistema tanto para la electroreducción como para la electrooxidación está regido por difusión pura.

Utilizando la ecuación de Randles – Sevcik (Ecuación 2.23), y considerando que se trata de un sistema regido por difusión; del valor de la pendiente se puede determinar el valor del coeficiente de difusión. Las figuras 4.9 y 4.10 muestran esta dependencia entre corriente de pico y la velocidad de barrido elevada a la $\frac{1}{2}$.

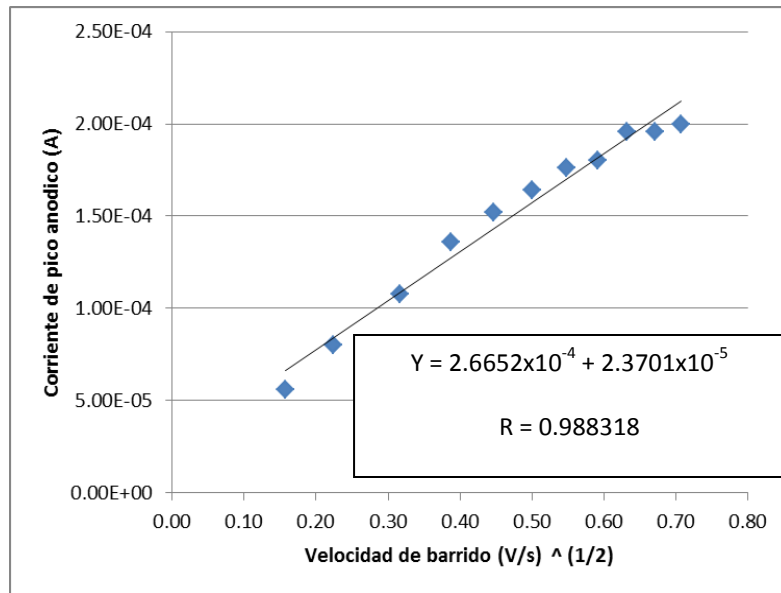


Figura 4.9 Corriente de pico anódica en función de la velocidad de barrido elevada a la $\frac{1}{2}$.

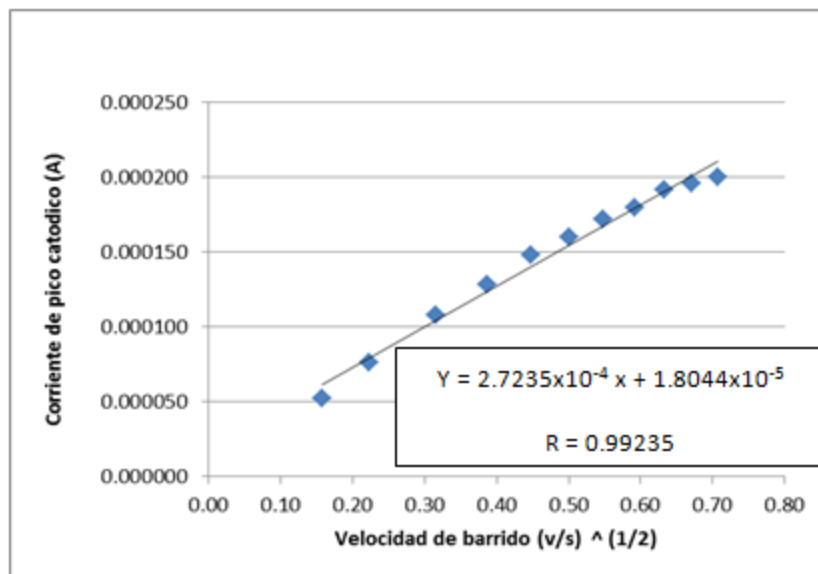


Figura 4.10 Corriente de pico catódica en función de la velocidad de barrido elevada a la $\frac{1}{2}$.

A partir de la ecuación de la línea recta de la figura 4.9 y conociendo la siguiente información:

- Concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$
- Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2
- n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 2.6652 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 2.6652 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 2.8308 \times 10^{-3}$$

$$D = 8.0139 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

A partir de la ecuación de la línea recta de la figura 4.10 y conociendo la siguiente información:

- Concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$
- Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2
- n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 2.7235 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 2.7235 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 2.8927 \times 10^{-3}$$

$$D = 8.3680 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

A partir de los coeficientes de difusión anódico y catódico se aprecia que hay un gran parecido entre éstos. Esto quiere decir que el sistema de $K_3[Fe(CN)_6]$ en ausencia de Hb en el medio amortiguado trabajado es reversible. Esto permite obtener un mecanismo electroquímico de referencia de manera confiable. El cual se propone a partir de la figura 4.11.

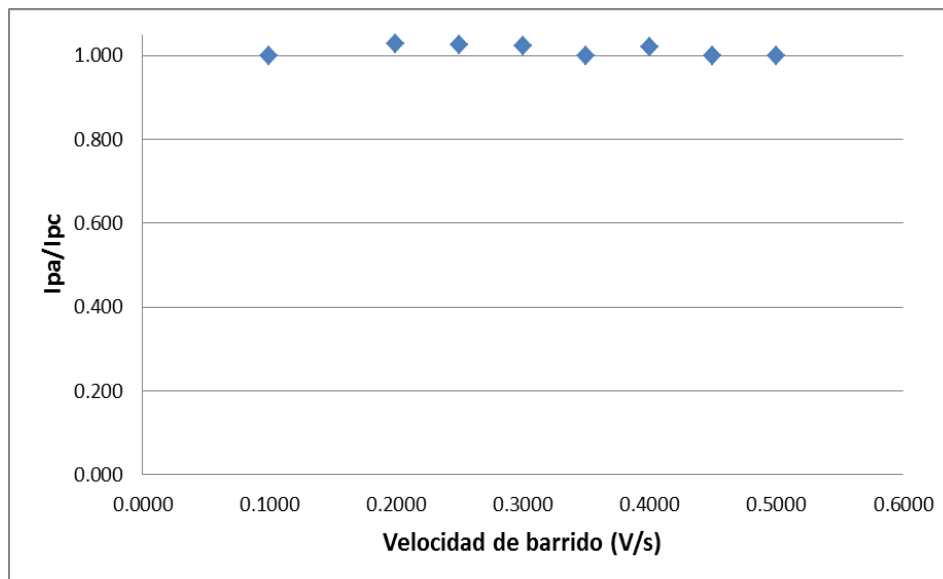
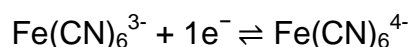
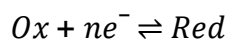


Figura 4.11 Cocientes de corriente de pico en función de la velocidad de barrido para la electroreducción del hexacianoferrato de potasio (III).

Se aprecia en la figura 4.10 una tendencia lineal de pendiente igual a 0; esto quiere decir que la electroreducción del $K_3[Fe(CN)_6]$ ocurre sin ninguna complicación química. Por lo tanto, de acuerdo con la Ecuación 2.35 se concluye que en el medio de referencia interno ocurre una transferencia de electrón reversible monoelectrónica. Es decir un mecanismo electroquímico Er.



4.1.3 Estudio voltamperométrico a diferentes concentraciones de Hb a velocidad de barrido fija (100 mV s^{-1})

Para este ensayo se consideró una concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$ de 0.01 mol L^{-1} presente en el medio amortiguado. A partir del cual se realizó la adición de alícuotas de la disolución de Hb 0.05 g mL^{-1} . Las adiciones fueron de $25 \mu\text{L}$ hasta $100 \mu\text{L}$. Tras cada adición se realizó el registro voltamperométrico tal como se muestra en la figura 4.12.

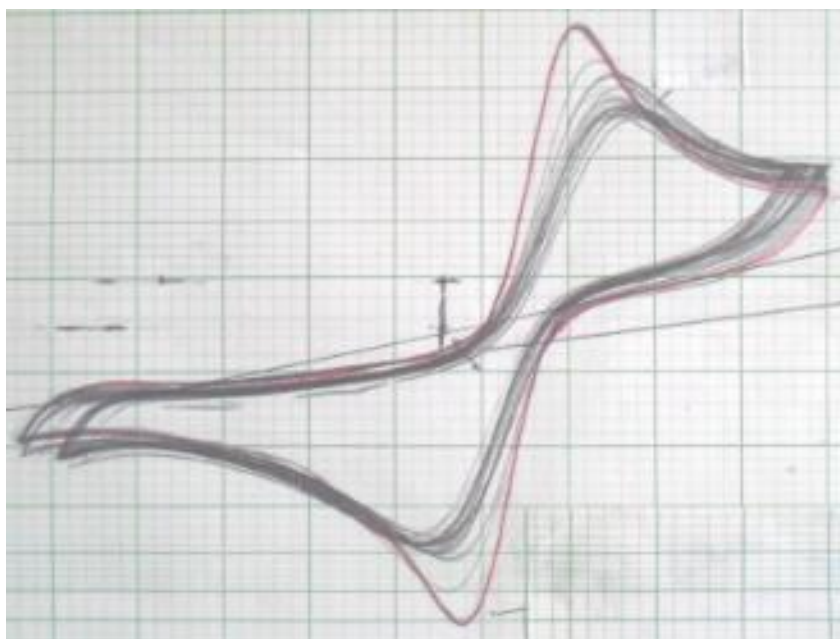


Figura 4.12 Registros voltamperométricos del $K_3[Fe(CN)_6]$ a diferentes concentraciones de Hb. ET: Pt° , ER: Ag° , EA: Carbon. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} . Medio TRIS y KNO_3 a pH 7.5.

En la figura 4.12 se aprecia como a partir de la adición de Hb la señal de corriente de pico disminuye e incluso los valores de potencial de pico se desplazan con respecto a la señal del $K_3[Fe(CN)_6]$ (la señal más intensa y definida). Sin embargo, a partir de la adición de $50\ \mu\text{L}$ en adelante la señal ya no disminuye siendo consecuencia de un posible proceso de interacción entre el $K_3[Fe(CN)_6]$ y la Hb, provocando que no llegue la suficiente cantidad de especie electroactiva $[Fe(CN)_6^{3-}]$ a la superficie del electrodo para que pueda ser reducida.

En la Tabla 4.5 y 4.6 se muestran los valores de potencial y corriente de pico respectivamente obtenidos tras cada barrido.

Tabla 4.5 Potenciales de pico anódico y catódico a diferentes concentraciones de Hb en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Volumen (μL)	Concentración (g mL ⁻¹)	Concentración de Hb (mol L ⁻¹)	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	E° = E 1/2 (V)	n
10	0.05	7.8125×10^{-7}	0.2481	0.000	0.248	0.124	0.24
20	0.1	1.5625×10^{-6}	0.2300	-0.030	0.260	0.100	0.23
30	0.15	2.34375×10^{-6}	0.2970	-0.033	0.330	0.132	0.18
40	0.2	3.125×10^{-6}	0.2727	0.000	0.273	0.136	0.22
50	0.25	3.90625×10^{-6}	0.2727	-0.033	0.305	0.120	0.20
60	0.3	4.6875×10^{-6}	0.2860	-0.044	0.330	0.121	0.18
70	0.35	5.46875×10^{-6}	0.2750	-0.033	0.308	0.121	0.19
80	0.4	6.25×10^{-6}	0.2530	-0.011	0.264	0.121	0.23
90	0.45	7.03125×10^{-6}	0.3020	-0.022	0.324	0.140	0.18
100	0.5	7.8125×10^{-6}	0.2865	-0.020	0.307	0.133	0.20

Tabla 4.6 Corrientes de pico anódico y catódico a diferentes concentraciones de Hb en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Volumen (μL)	Concentración (g mL ⁻¹)	Concentración de Hb (mol L ⁻¹)	I pico anódico (μA)	I pico catódico (μA)	I pico anódico (A)	I pico catódico (A)	I _{pa} /I _{pc}	I _{pc} /I _{pa}
0	0	7.8125×10^{-7}	181.8	181.8	0.0001818	-0.0001818	1.000	1.000
10	0.05	1.5625×10^{-6}	157.56	153.52	0.00015756	-0.00015352	1.026	0.974
20	0.1	2.34375×10^{-6}	145.44	137.36	0.00014544	-0.00013736	1.059	0.944
30	0.15	3.125×10^{-6}	133.32	125.24	0.00013332	-0.00012524	1.065	0.939
40	0.2	3.90625×10^{-6}	141.4	133.32	0.0001414	-0.00013332	1.061	0.943
50	0.25	4.6875×10^{-6}	129.28	125.24	0.00012928	-0.00012524	1.032	0.969
60	0.3	5.46875×10^{-6}	121.2	117.16	0.0001212	-0.00011716	1.034	0.967
70	0.35	6.25×10^{-6}	129.28	121.2	0.00012928	-0.0001212	1.067	0.938
80	0.4	7.03125×10^{-6}	133.32	129.28	0.00013332	-0.00012928	1.031	0.970
90	0.45	7.8125×10^{-6}	121.2	121.2	0.0001212	-0.0001212	1.000	1.000
100	0.5	7.8125×10^{-7}	121.2	121.2	0.0001212	-0.0001212	1.000	1.000

Es posible notar en la Tabla 4.5 que el valor de ΔE es mayor con respecto al valor obtenido en ausencia de Hb (Tabla 4.1), y como ya se había comentado no es posible determinar si el sistema es reversible o no a partir de los datos de potencial de pico. Para lo cual, es conveniente tomar el criterio de cocientes de corriente de pico. Analizando la Tabla 4.6 este cociente presenta un valor prácticamente igual a 1, evidenciando que la reversibilidad del sistema se mantiene en presencia de Hb; y como en el caso de ausencia de Hb, esta reversibilidad es mayor para la electroreducción con respecto a la electrooxidación. Es decir, la transferencia electrónica es más rápida en el caso de la electroreducción.

Las figuras 4.13 y 4.14 ilustran una posible saturación de la superficie del electrodo. Al ir adicionando Hb la señal de corriente de pico disminuye; sin embargo, llega un punto en que ésta no sufre cambios, manteniendo una corriente constante.

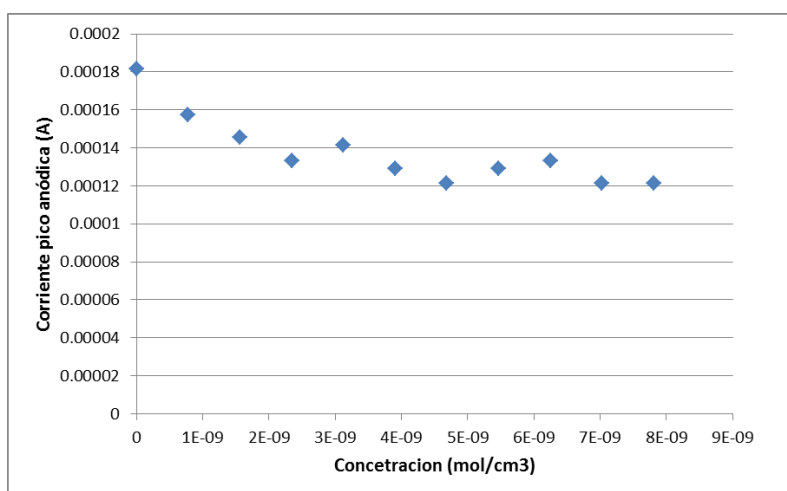


Figura 4.13 Corriente de pico anódica en función de la concentración de Hb adicionada.

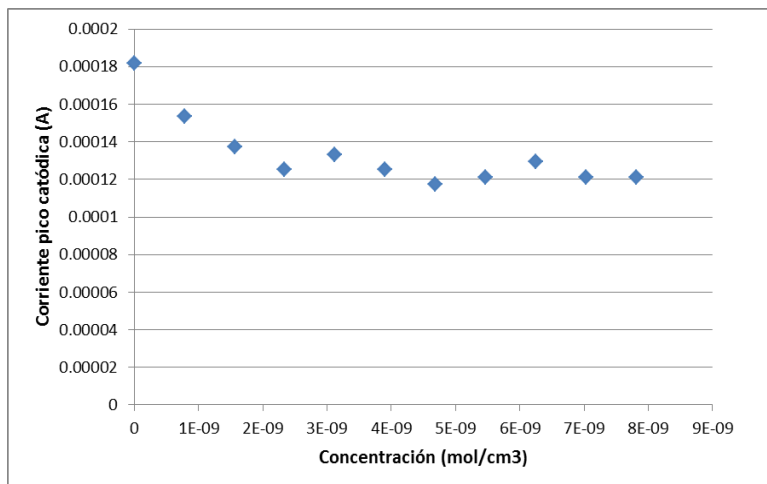


Figura 4.14 Corriente de pico catódica en función de la concentración de Hb adicionada.

4.1.4 Estudio voltamperométrico a diferentes velocidades de barrido a concentración fija de Hb

Como se describió en el capítulo 4 se procedió a realizar barridos de potencial a diferentes velocidades; para lo cual, la celda presentaba un volumen de 1000 μL $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ equivalente a una concentración de 0.01 mol L^{-1} en presencia de 10 mL de buffer y 100 μL de Hb 0.05 g mL^{-1} . Este ensayo se hizo también a 200, 300 y 400 μL . A partir de los datos obtenidos que se muestran en la Tabla 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 y 4.14 se procedió a procesar la información para determinar la reversibilidad del sistema y poder determinar un mecanismo electroquímico en presencia de Hb que sirva de referencia interna.

Tabla 4.7 Valores de potenciales de pico para el sistema $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ – Hb (100 μL).

100 μL

vel (mV s ⁻¹)	vel (V s ⁻¹)	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	$E_{1/2}$ (V)	n
25	0.025	0.1886	0.069	0.119	0.129	0.504
50	0.05	0.1858	0.059	0.127	0.122	0.472
100	0.1	0.2038	0.049	0.155	0.126	0.386
150	0.15	0.2870	0.163	0.124	0.225	0.483
200	0.2	0.2505	0.010	0.241	0.130	0.249
250	0.25	0.2184	0.028	0.190	0.123	0.316
300	0.3	0.2524	0.029	0.223	0.141	0.269
350	0.35	0.2640	0.009	0.255	0.137	0.236
400	0.4	0.2659	0.000	0.266	0.133	0.226
450	0.45	0.2794	-0.019	0.299	0.130	0.201
500	0.5	0.2912	-0.019	0.311	0.136	0.193

Tabla 4.8 Valores de potenciales de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6] - Hb$ (200 μL).

200 μL

vel ($mV s^{-1}$)	vel ($V s^{-1}$)	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	$E_{1/2}$ (V)	n
25	0.025	0.0992	0.040	0.060	0.069	1.008
50	0.05	0.1467	0.039	0.108	0.093	0.558
100	0.1	0.1941	0.029	0.165	0.112	0.364
150	0.15	0.2009	0.019	0.182	0.110	0.330
200	0.2	0.2023	0.000	0.202	0.101	0.297
250	0.25	0.2184	0.000	0.218	0.109	0.275
300	0.3	0.2426	0.000	0.243	0.121	0.247
350	0.35	0.2451	-0.009	0.255	0.118	0.236
400	0.4	0.2564	-0.019	0.275	0.119	0.218
450	0.45	0.2794	-0.039	0.318	0.120	0.189
500	0.5	0.2524	-0.039	0.291	0.107	0.206

Tabla 4.9 Valores de potenciales de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6] - Hb$ (300 μL).

300 μL

vel ($mV s^{-1}$)	vel ($V s^{-1}$)	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	$E_{1/2}$ (V)	n
25	0.025	0.1886	0.050	0.139	0.119	0.432
50	0.05	0.1956	0.049	0.147	0.122	0.409
100	0.1	0.2038	0.049	0.155	0.126	0.386
150	0.15	0.2104	0.029	0.182	0.120	0.330
200	0.2	0.2120	-0.010	0.222	0.101	0.271
250	0.25	0.2374	0.019	0.218	0.128	0.275
300	0.3	0.2524	-0.010	0.262	0.121	0.229
350	0.35	0.3017	-0.009	0.311	0.146	0.193
400	0.4	0.2754	-0.028	0.304	0.123	0.197
450	0.45	0.2891	-0.039	0.328	0.125	0.183
500	0.5	0.2912	-0.049	0.340	0.121	0.177

Tabla 4.10 Valores de potenciales de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6] - Hb$ (400 μ L).

400 μ L

vel (mV s ⁻¹)	vel (V s ⁻¹)	E pico anódico (V)	E pico catódico (V)	ΔE (V)	E _{1/2} (V)	n
25	0.025	0.1886	0.030	0.159	0.109	0.378
50	0.05	0.1956	0.039	0.156	0.117	0.384
100	0.1	0.2135	0.029	0.184	0.121	0.325
150	0.15	0.2200	0.010	0.210	0.115	0.285
200	0.2	0.2216	0.000	0.222	0.111	0.271
250	0.25	0.2184	0.009	0.209	0.114	0.287
300	0.3	0.2718	0.010	0.262	0.141	0.229
350	0.35	0.2829	0.000	0.283	0.141	0.212
400	0.4	0.2659	-0.028	0.294	0.119	0.204
450	0.45	0.3083	-0.019	0.328	0.145	0.183
500	0.5	0.3203	-0.039	0.359	0.141	0.167

Tabla 4.11 Valores de corrientes de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6] - Hb$ (100 μ L).

100 μ L

vel (mV s ⁻¹)	vel (V s ⁻¹)	I pico anódica (μ A)	I pico catódica (μ A)	I pico anódica (A)	I pico catódica (A)	I _{pa} /I _{pc}	I _{pc} /I _{pa}
25	0.0250	32.000	32.000	3.2000E-05	-0.00003200	1.000	1.000
50	0.0500	44.000	44.000	4.4000E-05	-0.00004400	1.000	1.000
100	0.1000	64.000	64.000	6.4000E-05	-0.00006400	1.000	1.000
150	0.1500	72.000	68.000	7.2000E-05	-0.00006800	1.059	0.944
200	0.2000	72.000	68.000	7.2000E-05	-0.00006800	1.059	0.944
250	0.2500	92.000	88.000	9.2000E-05	-0.00008800	1.045	0.957
300	0.3000	100.000	92.000	1.0000E-04	-0.00009200	1.087	0.920
350	0.3500	104.000	96.000	1.0400E-04	-0.00009600	1.083	0.923
400	0.4000	104.000	100.000	1.0400E-04	-0.00010000	1.040	0.962
450	0.4500	108.000	104.000	1.0800E-04	-0.00010400	1.038	0.963
500	0.5000	112.000	104.000	1.1200E-04	-0.00010400	1.077	0.929

Tabla 4.12 Valores de corrientes de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6]$ – Hb (200 μ L).

200 μ L

vel (mV s ⁻¹)	vel (V s ⁻¹)	I pico anódica (μ A)	I pico catódica (μ A)	I pico anódica (A)	I pico catódica (A)	Ipa/Ipc	Ipc/Ipa
25	0.0250	40.000	40.000	4.0000E-05	-0.00004000	1.000	1.000
50	0.0500	60.000	56.000	6.0000E-05	-0.00005600	1.071	0.933
100	0.1000	80.000	76.000	8.0000E-05	-0.00007600	1.053	0.950
150	0.1500	96.000	88.000	9.6000E-05	-0.00008800	1.091	0.917
200	0.2000	104.000	100.000	1.0400E-04	-0.00010000	1.040	0.962
250	0.2500	120.000	112.000	1.2000E-04	-0.00011200	1.071	0.933
300	0.3000	132.000	124.000	1.3200E-04	-0.00012400	1.065	0.939
350	0.3500	144.000	128.000	1.4400E-04	-0.00012800	1.125	0.889
400	0.4000	148.000	148.000	1.4800E-04	-0.00014800	1.000	1.000
450	0.4500	148.000	148.000	1.4800E-04	-0.00014800	1.000	1.000
500	0.5000	148.000	148.000	1.4800E-04	-0.00014800	1.000	1.000

Tabla 4.13 Valores de corrientes de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6]$ – Hb (300 μ L).

300 μ L

vel (mV s ⁻¹)	vel (V s ⁻¹)	I pico anódica (μ A)	I pico catódica (μ A)	I pico anódica (A)	I pico catódica (A)	Ipa/Ipc	Ipc/Ipa
25	0.0250	40.000	40.000	4.0000E-05	-0.00004000	1.000	1.000
50	0.0500	60.000	56.000	6.0000E-05	-0.00005600	1.071	0.933
100	0.1000	84.000	76.000	8.4000E-05	-0.00007600	1.105	0.905
150	0.1500	100.000	88.000	1.0000E-04	-0.00008800	1.136	0.880
200	0.2000	100.000	100.000	1.0000E-04	-0.00010000	1.000	1.000
250	0.2500	120.000	120.000	1.2000E-04	-0.00012000	1.000	1.000
300	0.3000	124.000	112.000	1.2400E-04	-0.00011200	1.107	0.903
350	0.3500	128.000	116.000	1.2800E-04	-0.00011600	1.103	0.906
400	0.4000	136.000	128.000	1.3600E-04	-0.00012800	1.063	0.941
450	0.4500	136.000	132.000	1.3600E-04	-0.00013200	1.030	0.971
500	0.5000	144.000	136.000	1.4400E-04	-0.00013600	1.059	0.944

Tabla 4.14 Valores de corrientes de pico para el sistema $K_3[Fe(CN)_6]$ – Hb (400 μ L).

400 μ L

vel ($mV s^{-1}$)	vel ($V s^{-1}$)	I pico anódica (μA)	I pico catódica (μA)	I pico anódica (A)	I pico catódica (A)	I_{pa}/I_{pc}	I_{pc}/I_{pa}
25	0.0250	36.000	32.000	3.6000E-05	-0.00003200	1.125	0.889
50	0.0500	52.000	48.000	5.2000E-05	-0.00004800	1.083	0.923
100	0.1000	72.000	68.000	7.2000E-05	-0.00006800	1.059	0.944
150	0.1500	88.000	84.000	8.8000E-05	-0.00008400	1.048	0.955
200	0.2000	104.000	100.000	1.0400E-04	-0.00010000	1.040	0.962
250	0.2500	120.000	108.000	1.2000E-04	-0.00010800	1.111	0.900
300	0.3000	124.000	116.000	1.2400E-04	-0.00011600	1.069	0.935
350	0.3500	124.000	120.000	1.2400E-04	-0.00012000	1.033	0.968
400	0.4000	128.000	124.000	1.2800E-04	-0.00012400	1.032	0.969
450	0.4500	132.000	124.000	1.3200E-04	-0.00012400	1.065	0.939
500	0.5000	128.000	128.000	1.2800E-04	-0.00012800	1.000	1.000

Analizando las Tablas mostradas anteriormente, una vez más los valores de ΔE son mayores a 60 mV (criterio de reversibilidad) además de mostrar valores de n de orden fraccionario. Sin embargo al analizar una vez más los cocientes de corriente de pico estos muestran un valor de 1 (característico de un sistema reversible) sin importar la concentración de Hb en el medio de reacción. En las cuatro concentraciones (a las cuales se les aplicó velocidades de barrido diferentes), se mostró la tendencia de que la electroreducción muestra un mayor carácter reversible con respecto a la electrooxidación evidenciando así que proceso es más rápido.

A continuación en las figuras 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18 se muestran las gráficas de las funciones de cociente de corriente de pico en función de la velocidad de barrido a la $\frac{1}{2}$ y la función correspondiente a la Ecuación 2.23, lo cual nos permitirá determinar si el proceso de difusión se mantiene aún en presencia de Hb.

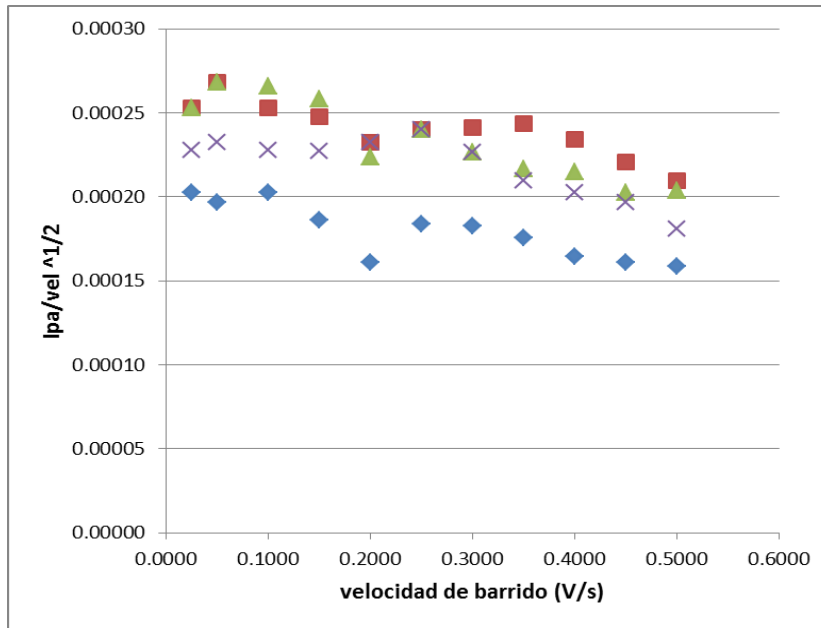


Figura 4.15 Evaluación del tipo de transporte de masa característico del sistema en presencia de Hb para la corriente de pico anódica (Azul: 100 μL , Verde: 200 μL , Rojo: 300 μL y Morado: 400 μL).

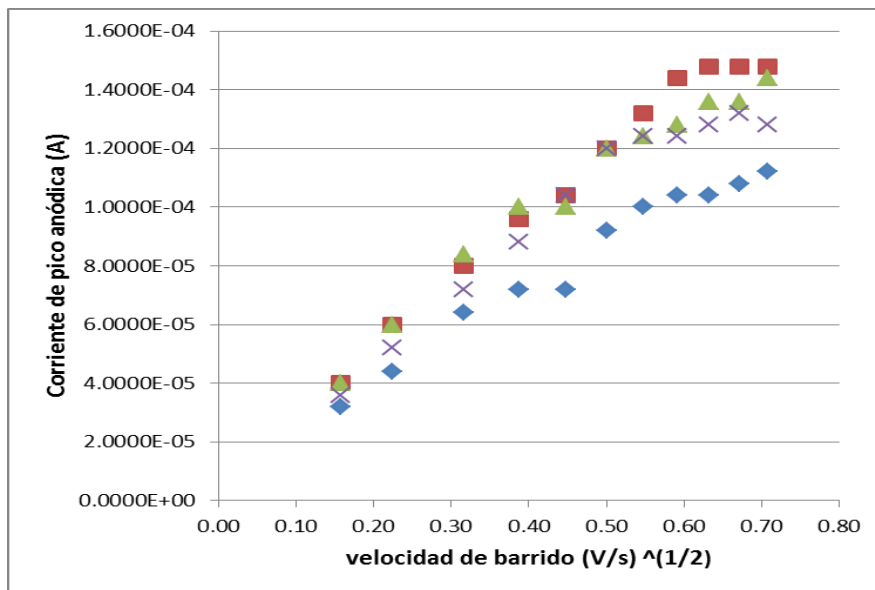


Figura 4.16 Corriente de pico anódica en función de la velocidad de barrido elevada a la $\frac{1}{2}$ (Azul: 100 μL , Verde: 200 μL , Rojo: 300 μL y Morado: 400 μL).

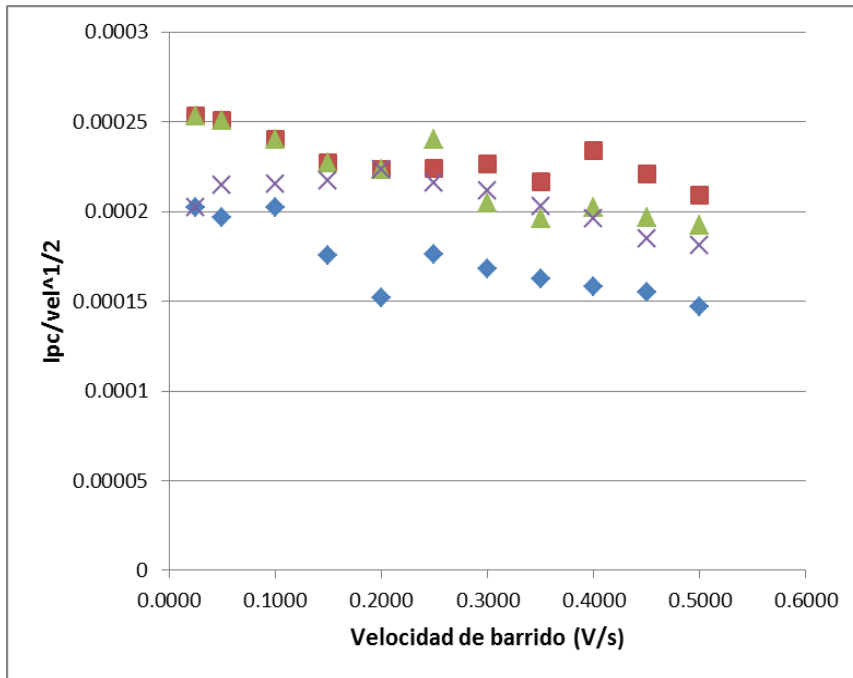


Figura 4.17 Evaluación del tipo de transporte de masa característico del sistema en presencia de Hb para la corriente de pico catódica (Azul: 100 μL , Verde: 200 μL , Rojo: 300 μL y Morado: 400 μL).

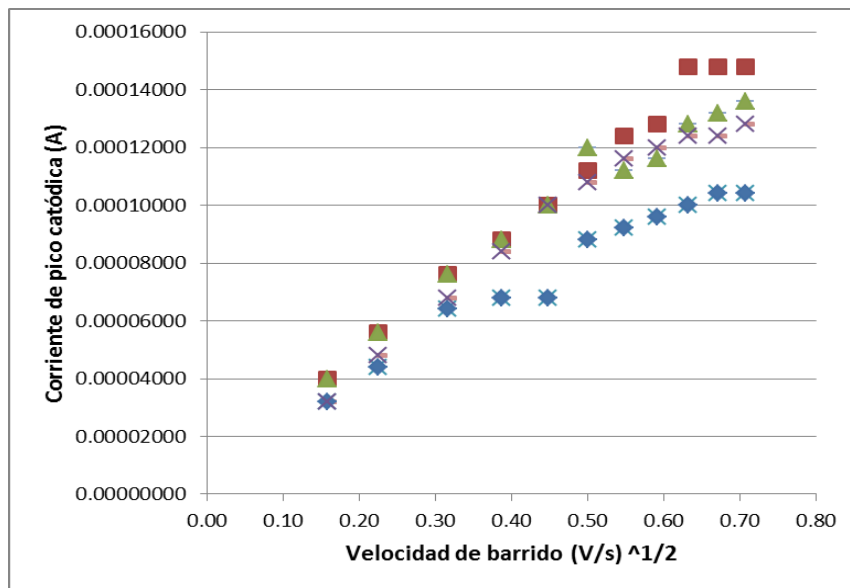


Figura 4.18 Corriente de pico catódica en función de la velocidad de barrido elevada a la $\frac{1}{2}$ (Azul: 100 μL , Verde: 200 μL , Rojo: 300 μL y Morado: 400 μL).

Al apreciar las figuras anteriores es posible ver que hay una tendencia de que el régimen de transporte de masa hacia la superficie del electrodo pueda ser de tipo difusional puro. Una forma de confirmarlo es una vez más, obtener una pendiente igual a 0.5 para una gráfica donde el logaritmo de la corriente de pico sea función del logaritmo de la velocidad de barrido.

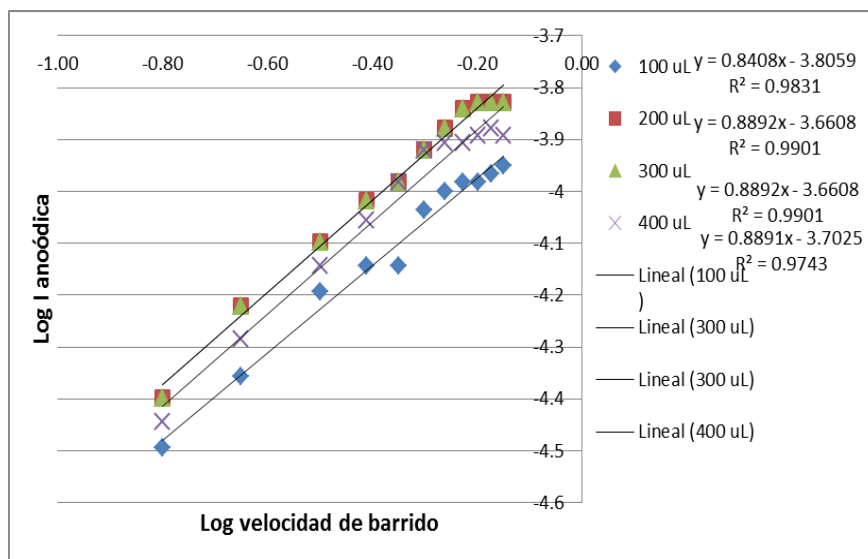


Figura 4.19 Logaritmo de la corriente de pico anódica en función del logaritmo de la velocidad de barrido (Azul: 100 μ L, Verde: 200 μ L, Rojo: 300 μ L y Morado: 400 μ L).

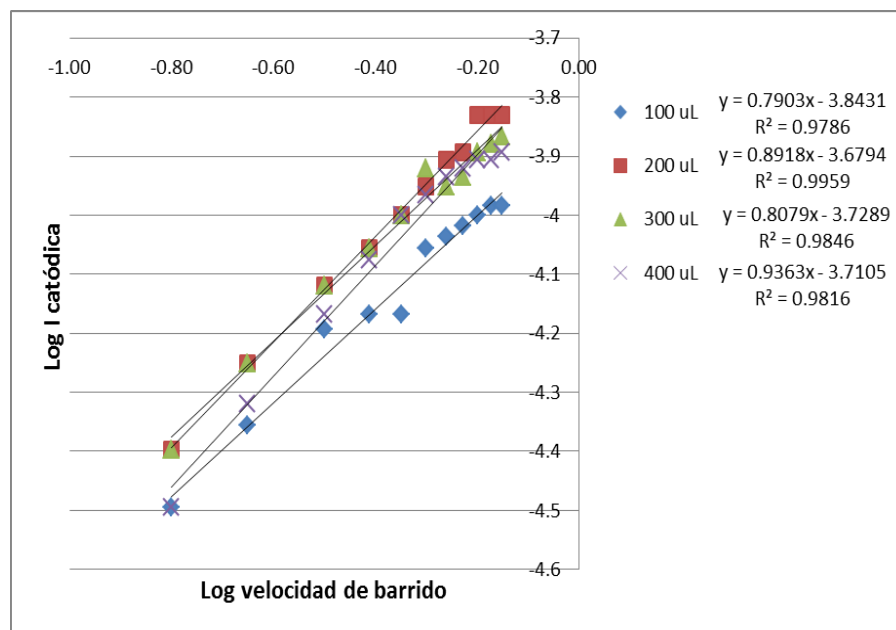


Figura 4.20 Logaritmo de la corriente de pico catódica en función del logaritmo de la velocidad de barrido (Azul: 100 μ L, Verde: 200 μ L, Rojo: 300 μ L y Morado: 400 μ L).

La pendiente de la línea recta de las figuras 4.19 y 4.20 indican que el transporte de masa por difusión se va perdiendo pues no presenta una pendiente cercana a 0.5; es posible, que la causa de esto sea una reacción química acoplada entre el $K_3[Fe(CN)_6]$ y la Hb causando problemas para que la especie electroactiva $[Fe(CN)_6^{3-}]$ llegue por difusión del seno de la disolución a la superficie del electrodo de platino. Por tanto, se esperarían desviaciones importantes del valor del coeficiente de difusión del $K_3[Fe(CN)_6]$ por la presencia de Hb. La evaluación de los valores del coeficiente de difusión se dan a partir de las ecuaciones de las líneas rectas que se obtienen a partir de las gráficas de la Figura 4.16 y 4.18.

La evaluación de los coeficientes de difusión anódicos se muestra a continuación a partir de las Figura 4.16:

- Para 100 μ L (7.8115×10^{-9} mol cm^{-3}) de Hb

Ecuación de la línea recta: $1.4724 \times 10^{-4} x + 1.2710 \times 10^{-5}$ ($r= 0.985001$)

Concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$: 1×10^{-5} mol cm^{-3}

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

$n: 1$

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 1.4724 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 1.4724 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 1.5638 \times 10^{-3}$$

$$D = 2.4457 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

- Para 200 μL ($1.5625 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $2.0693 \times 10^{-4} x + 1.3271 \times 10^{-5}$ ($r= 0.988120$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 2.0693 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 2.0693 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 2.1979 \times 10^{-3}$$

$$D = 4.8310 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

- Para 300 μL ($2.3437 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $1.8111 \times 10^{-4} x + 2.1091 \times 10^{-5}$ ($r= 0.984038$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 1.8111 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 1.8111 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 1.9237 \times 10^{-3}$$

$$D = 3.7006 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

- Para 400 μL ($3.1250 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $1.8002 \times 10^{-4} x + 1.5788 \times 10^{-5}$ ($r= 0.969139$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

$n: 1$

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 1.8002 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 1.8002 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 1.9120 \times 10^{-3}$$

$$D = 3.6561 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

La evaluación de los coeficientes de difusión catódicos se muestra a continuación a partir de la Figura 4.18:

- Para 100 μL ($7.8125 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $1.3341 \times 10^{-4} x + 1.5233 \times 10^{-5}$ ($r= 0.983500$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

$n: 1$

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 1.3341 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 1.3341 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 1.4170 \times 10^{-3}$$

$$D = 2.0080 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

- Para 200 μL ($1.5625 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $2.0578 \times 10^{-4} x + 9.0907 \times 10^{-5}$ ($r= 0.994352$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 2.0578 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 2.0578 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 2.1856 \times 10^{-3}$$

$$D = 4.7771 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

- Para 300 μL ($2.3437 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $1.7175 \times 10^{-4} x + 1.9328 \times 10^{-5}$ ($r= 0.982999$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 1.717517 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 1.7175 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 1.8242 \times 10^{-3}$$

$$D = 3.3278 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

- Para 400 μL ($3.1250 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$) de Hb

Ecuación de la línea recta: $1.7888 \times 10^{-4} x + 1.1233 \times 10^{-5}$ ($r = 0.981471$)

Concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$

Área de superficie del electrodo: 0.035 cm^2

n : 1

Sustituyendo la información apropiada en la Ecuación 2.23:

$$(2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) D^{1/2} (1 \times 10^{-5}) = 1.7888 \times 10^{-4}$$

$$D^{1/2} = 1.7888 \times 10^{-4} / (2.69 \times 10^5) (1)^{3/2} (0.035) (1 \times 10^{-5})$$

$$D^{1/2} = 1.9000 \times 10^{-3}$$

$$D = 3.6101 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

En la Tabla 4.15 se presentan los valores de coeficiente de difusión anódico y catódico para cada adición de Hb. Para un sistema reversible ideal el valor del coeficiente de difusión anódico debe ser un valor muy aproximado o igual al valor del coeficiente de difusión catódico. Cabe resaltar que en presencia de Hb el valor del coeficiente de difusión para la especie $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ disminuye drásticamente; confirmando así una reacción química acoplada del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ con la Hb. La Hb reacciona con el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (reacción redox o de complejación) evitando que llegue menos especie electroactiva a la superficie del electrodo, hay un consumo considerable de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ por parte de la Hb.

Tabla 4.15 Valores de coeficiente de difusión de la especie electroactiva $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ en presencia de Hb.

Volumen adicionado de Hb (μL)	Coefficiente de difusión anódico ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	Coefficiente de difusión catódico ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
0	8.0139×10^{-6}	8.3680×10^{-6}
100	2.4457×10^{-6}	2.0080×10^{-6}
200	4.8310×10^{-6}	4.7771×10^{-6}
300	3.7006×10^{-6}	3.3278×10^{-6}
400	3.6561×10^{-6}	3.6101×10^{-6}

La figura 4.21 muestra los voltamperogramas del hexacianoferrato de potasio (III) en presencia de hemoglobina (100 μL) a diferentes velocidades de barrido.

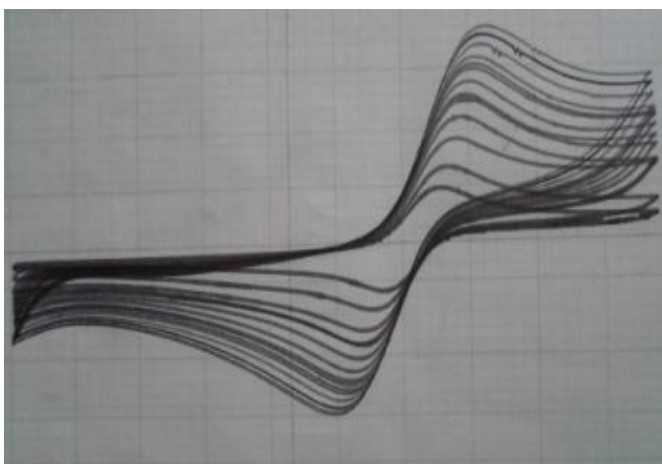


Figura 4.21 Registros voltamperométricos del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en presencia de Hb a diferentes velocidades de barrido a concentración fija de Hb (7.8125 μM). ET: Pt° , ER: Ag° , EA: Carbón. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} . Medio TRIS y KNO_3 a pH 7.5.

A partir de la información anterior, se elaboró el perfil de cociente de corrientes de pico en función de la velocidad de barrido (a cada concentración de Hb) de tal manera que se pudiera determinar de acuerdo con el perfil, el tipo de mecanismo electroquímico que corresponde.

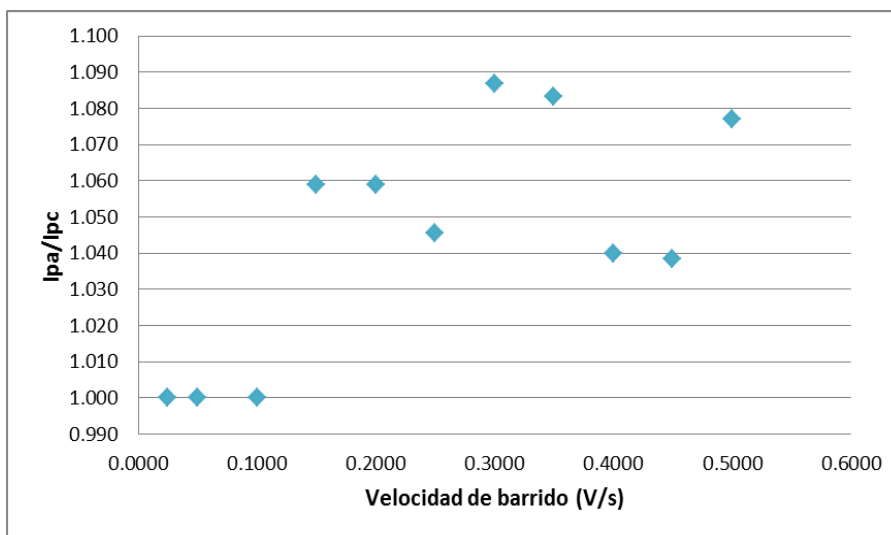


Figura 4.22 Cociente de corriente de pico anódico entre el catódico en función de la velocidad de barrido (100 μL de Hb).

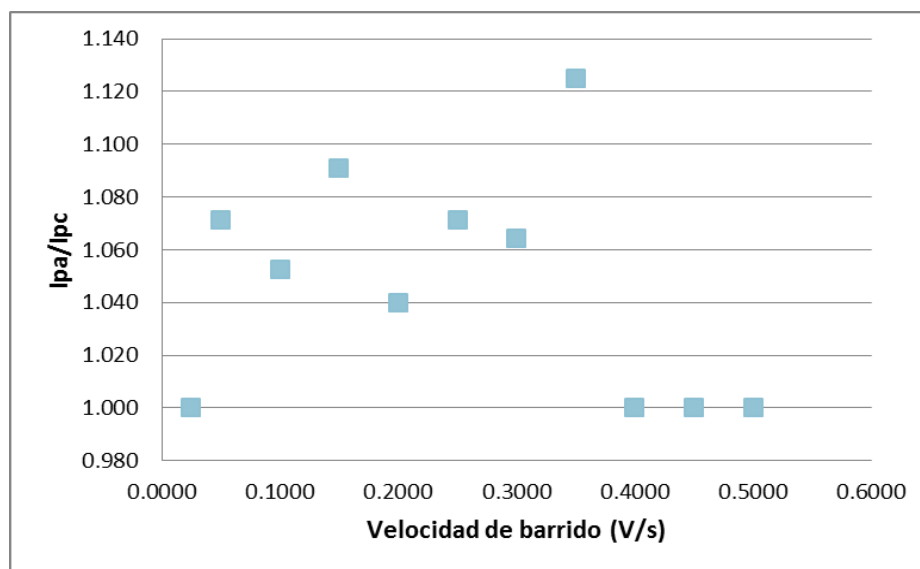


Figura 4.23 Cociente de corriente de pico anódico entre el catódico en función de la velocidad de barrido (200 µL de Hb).

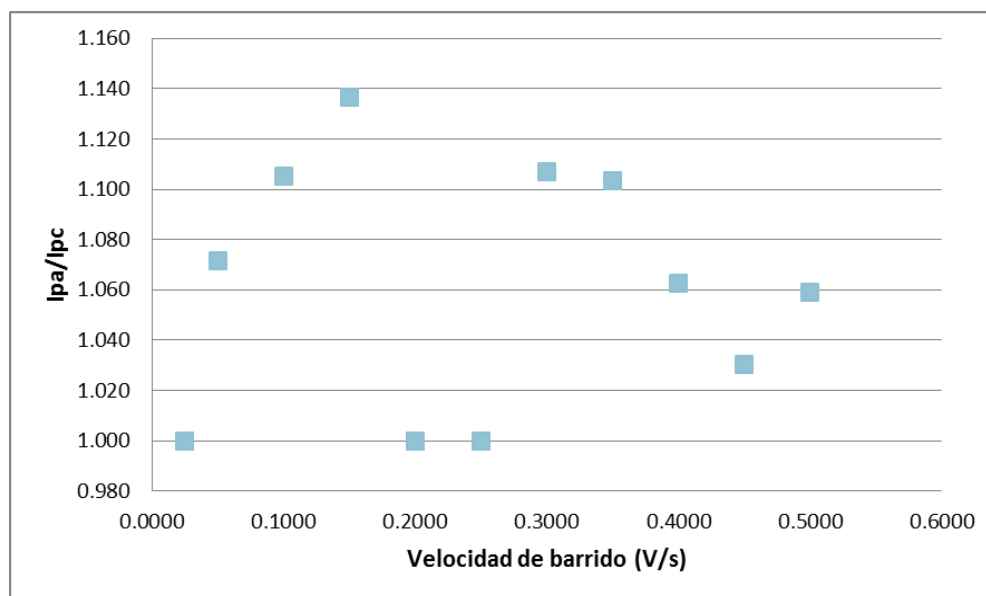


Figura 4.24 Cociente de corriente de pico anódico entre el catódico en función de la velocidad de barrido (300 µL de Hb).

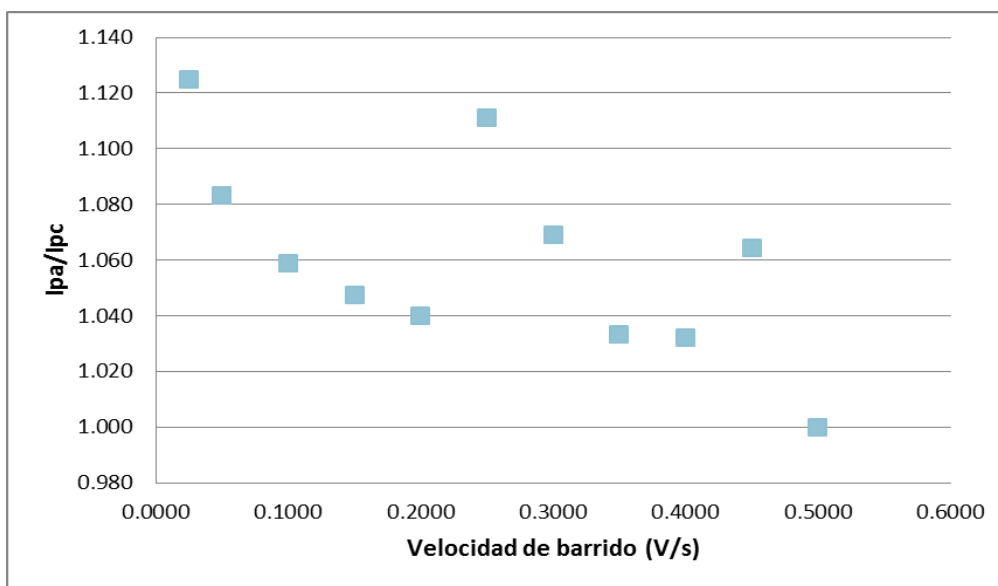


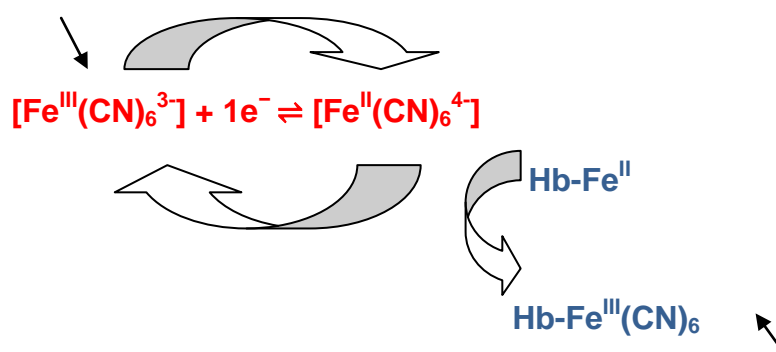
Figura 4.25 Cociente de corriente de pico anódico entre el catódico en función de la velocidad de barrido (400 µL de Hb).

Las Figuras 4.22, 4.23, 4.24 y 4.25 muestran un perfil totalmente distinto al reportado en la literatura para cada concentración de Hb que se trabajó (100, 200, 300 y 400 µL). La causa de esto, puede ser debido a un proceso en que no sólo hay un cambio redox en el átomo de hierro de cada grupo hemo de la proteína de la Hb; es decir, que la proteína misma esté sufriendo cambios en su estructura. Por medio de una reacción de tipo coordinación con la especie electroactiva $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. El posible compuesto de coordinación formado presenta una actividad electroquímica que pudiera opacar la actividad redox del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ dado su poca estabilidad y por tanto no es posible observar una respuesta reproducible.

Otra posible causa es que la proteína se esté adsorbiendo a la superficie del electrodo (lo cual correspondería a cada perfil obtenido) provocando que no se pueda tener una respuesta clara del proceso redox del sistema $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] - \text{Hb}$, sería en su lugar, proteína – Hb.

Sin embargo, se esperaría que entre el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y Hb exista un mecanismo de reacción de tipo E_1C_r catalítico.

Reacción electroquímica principal:



Reacción química acoplada.

De acuerdo con lo anterior, el Fe^{III} (donde la corriente de pico es proporcional a $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$) presenta una reacción química principal reversible dando como producto $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$. En presencia de Hb, el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ propicia la formación del complejo $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6$, disminuyendo así el valor de la corriente de pico. El $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ sirve como fuerza motriz para formar el complejo $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6$ además de sufrir una electrooxidación formando nuevamente $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, especie con la que se inició el proceso.

4.2 Parte II. Caracterización por potenciometría a corriente nula ($i=0$)

Para confirmar un proceso de reacción química acoplada que se propone en la Parte I del capítulo 4 del presente trabajo, se procede a realizar un experimento análogo a lo que sería una titulación potenciométrica. Tal como se describió en el capítulo 3 se realizan adiciones de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a una celda electroquímica que tiene presente un volumen conocido de buffer (1 mL) y se monitorea el potencial con respecto a un tiempo de muestreo fijo de 300 s. Con el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ presente en el medio (500 μL) se empiezan las adiciones de Hb y nuevamente se monitorea el potencial con respecto al tiempo que dura el experimento.

En la figura 4.26 se muestra el potencial que adquiere el electrodo de trabajo con respecto al de referencia durante las adiciones de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Se aprecia como conforme adicionamos una mayor concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ el potencial aumenta considerablemente con respecto al blanco (buffer). Sin embargo, llega un punto en el que la separación de potenciales entre cada adición es menor.

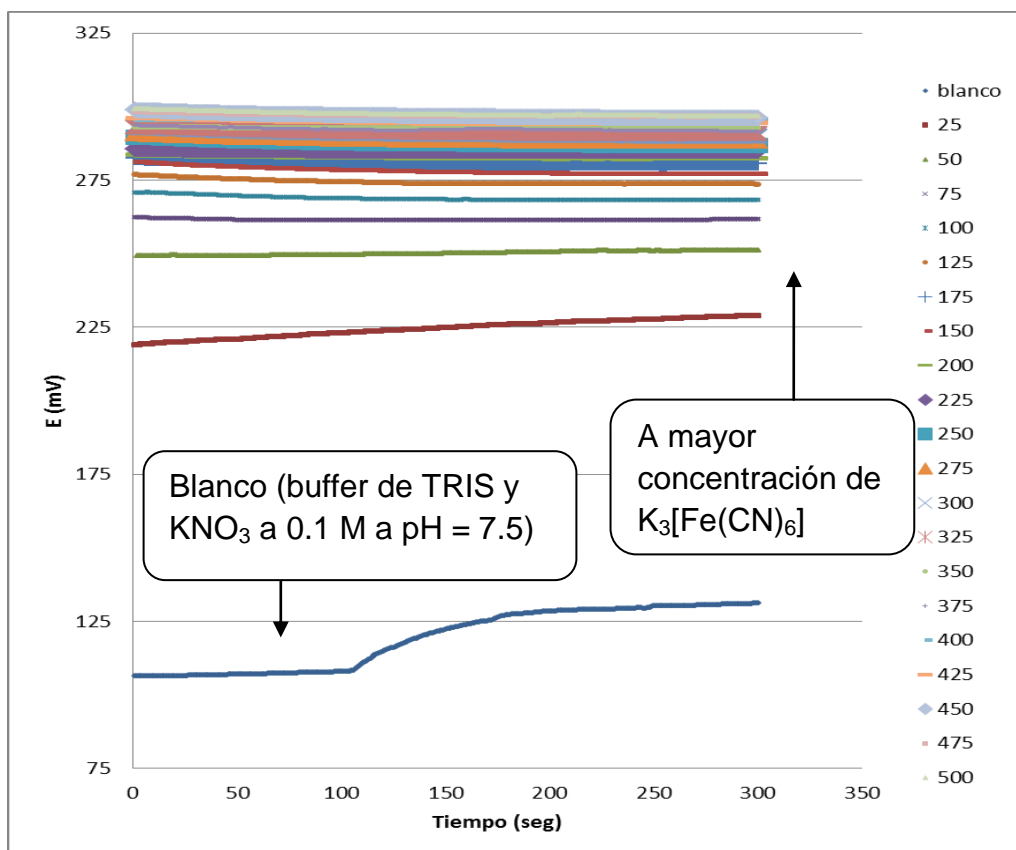


Figura 4.26 Potencial en función del tiempo en ausencia de Hb en medio amortiguado.

El salto que se observa en el registro del blanco es debido a impurezas del mismo disolvente o incluso del oxígeno disuelto en el medio.

Cuando se realizan las adiciones de Hb estando presente el $K_3[Fe(CN)_6]$, el potencial con respecto a la última adición de $K_3[Fe(CN)_6]$ disminuye tal como se muestra en la figura 4.27, pero llega un punto en que por más que agreguemos Hb, el salto de potencial es pequeño. Esto quiere decir que la Hb ya no reacciona con $K_3[Fe(CN)_6]$, debido a que éste es el reactivo limitante.

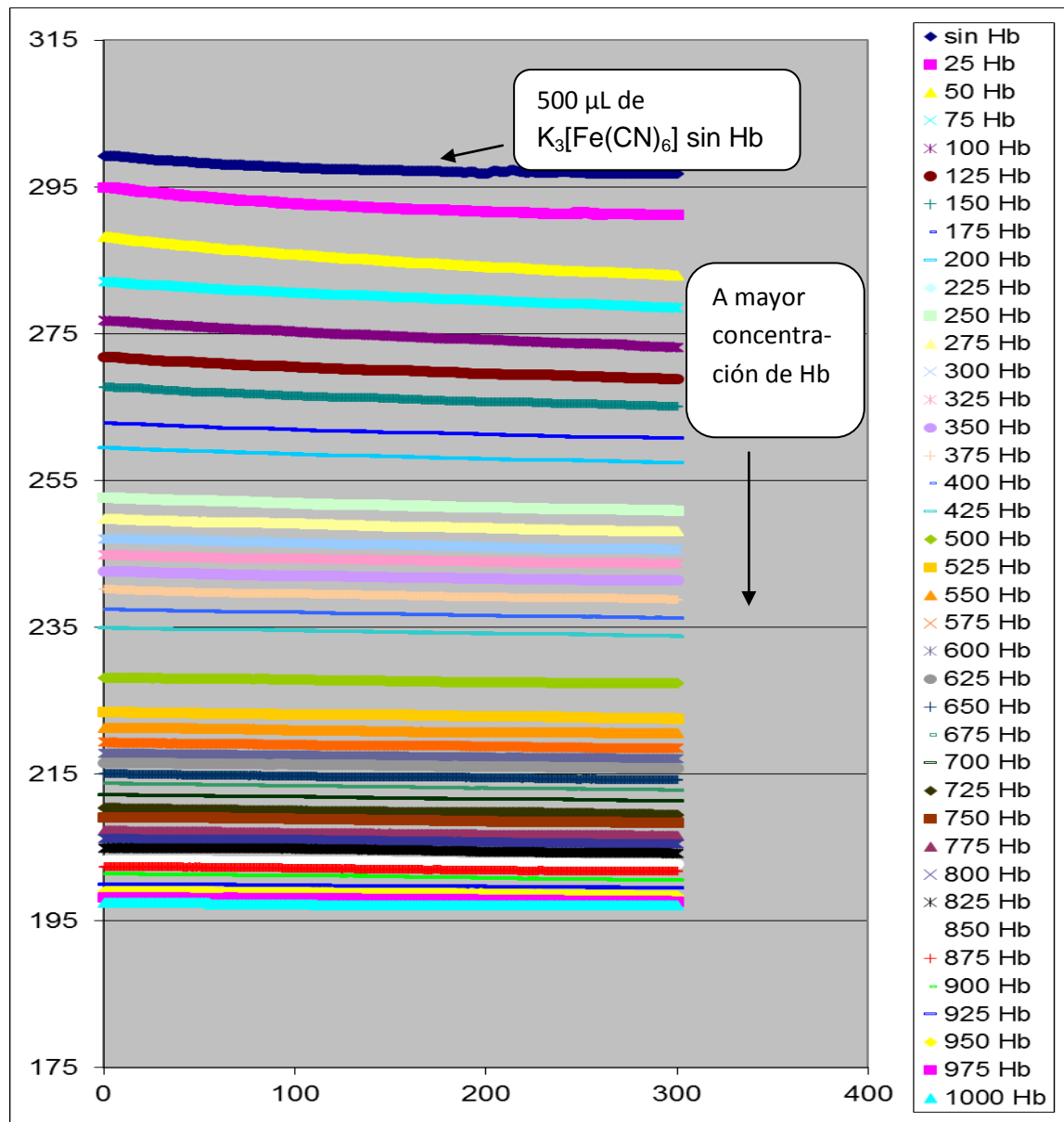


Figura 4.27 Potencial en función del tiempo en presencia de Hb en medio amortiguado.

Si graficamos los datos de potencial a un tiempo de muestreo de 250 s, en función de la concentración añadida de $K_3[Fe(CN)_6]$ se observa que al comenzar la adición, el potencial aumenta dado que se añade puro oxidante, alcanzando una región de estabilidad, sin embargo, cuando se empieza la adición de Hb (en presencia del $K_3[Fe(CN)_6]$) este potencial baja. Esto confirma la presencia de una reacción acoplada entre estos analitos. Este tratamiento analítico permite hacer la analogía como si estuviéramos haciendo una titulación ácido base.

La figura 4.28 muestra como conforme agregamos $K_3[Fe(CN)_6]$, el potencial del sistema aumenta alcanzando una región de estabilidad.

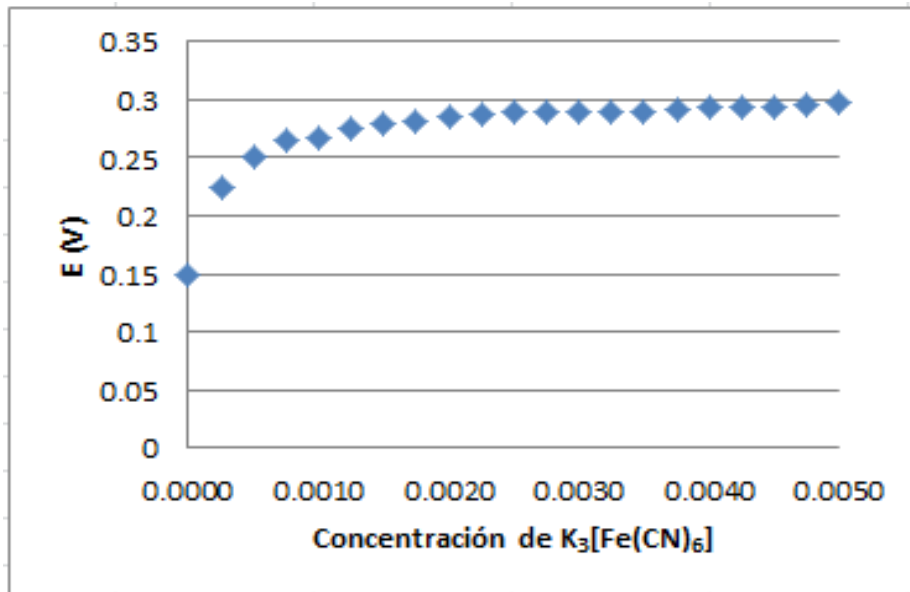


Figura 4.28 Potencial en función de la concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$.

La figura 4.29 muestra el potencial como una función del logaritmo de la concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$. Se aprecia que se muestra una tendencia de línea recta cuya pendiente es 0.059 V lo cual es predicho por la ecuación de Nernst para sistemas reversibles. Por tanto, se demuestra la reversibilidad del sistema en ausencia de Hb.

La figura 4.30 muestra como conforme agregamos Hb en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$, el potencial redox del sistema disminuye demostrando así una interacción de tipo complejo entre los analitos.

La figura 4.31 muestra el potencial como una función del logaritmo de la concentración de Hb. Se aprecia que se pierde la tendencia de línea recta. Éste valor demuestra que la reversibilidad del $K_3[Fe(CN)_6]$ es afectada por la presencia de Hb. Confirmando una reacción química acoplada

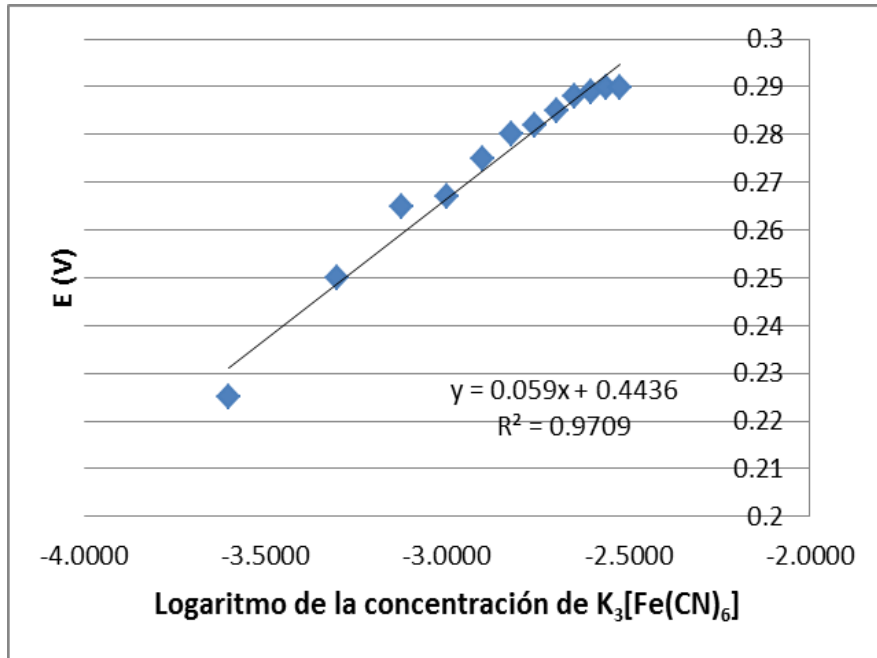


Figura 4.29 Potencial en función del logaritmo de la concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$.

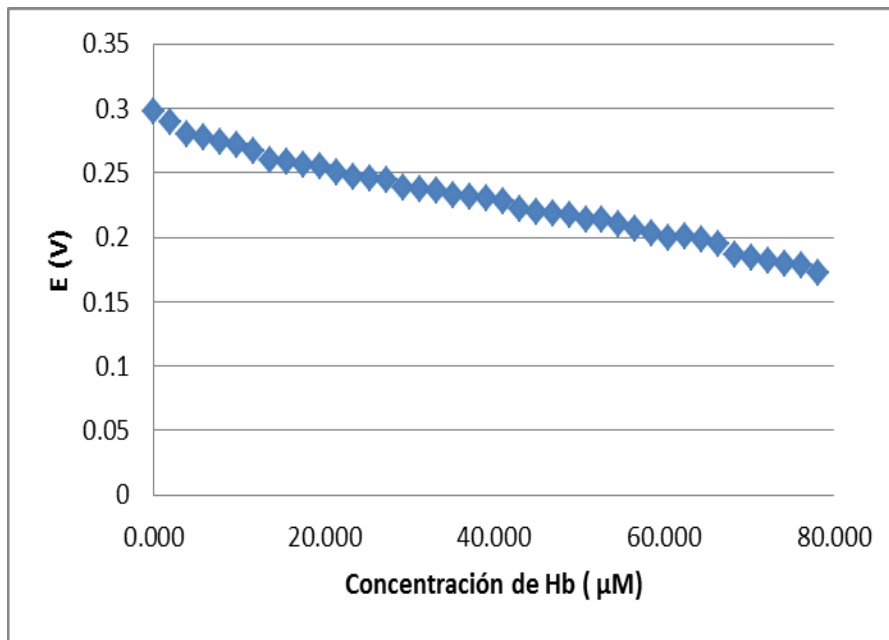


Figura 4.30 Potencial en función de la concentración de Hb en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$.

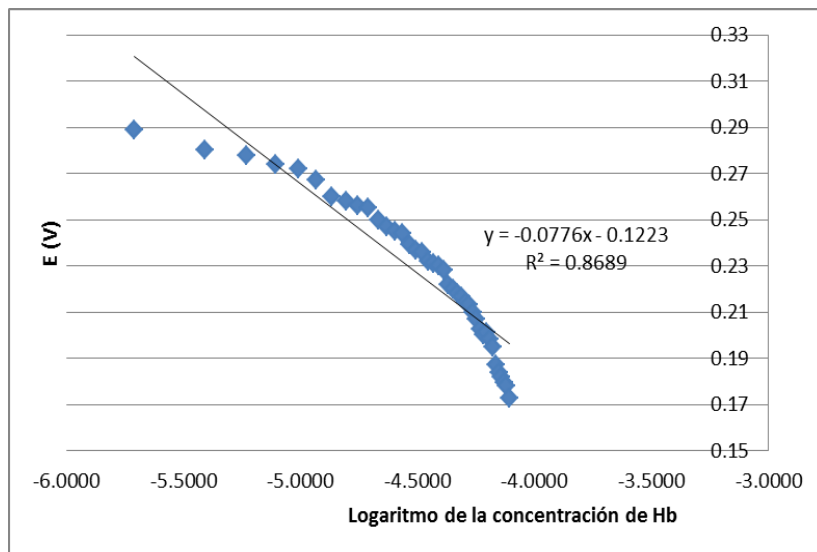


Figura 4.31 Potencial en función del logaritmo de la concentración de Hb en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Considerando que sólo está presente un solo par redox (dado que se trabaja a corriente nula; es decir, no hay electrólisis que genere el par redox completo) será difícil determinar el punto de equivalencia. En la figura 4.32 se muestra el potencial en función de la fracción mol de Hb adicionada.

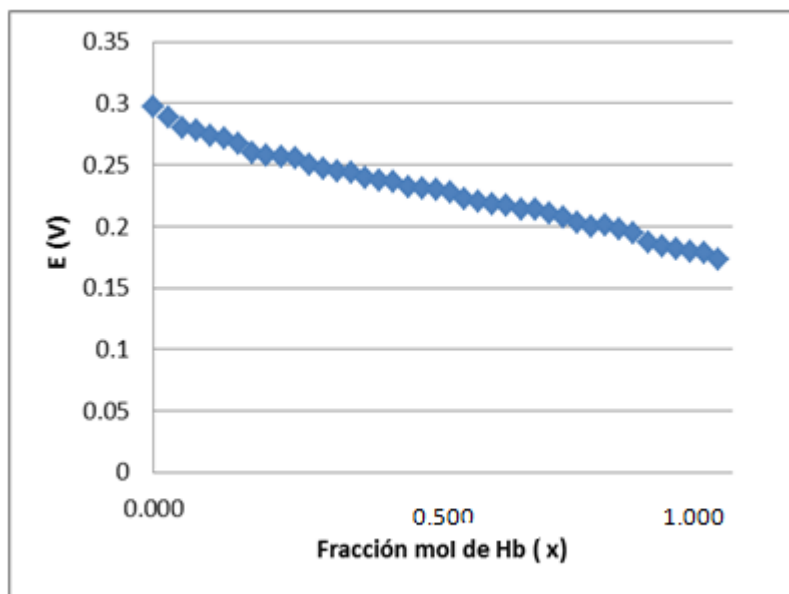


Figura 4.32 Potencial del $K_3[Fe(CN)_6]$ en función de la fracción mol (x) de Hb.
ET: Pt° , ER: $Ag^\circ/Buffer$.

Capítulo 5. Conclusiones y expectativas

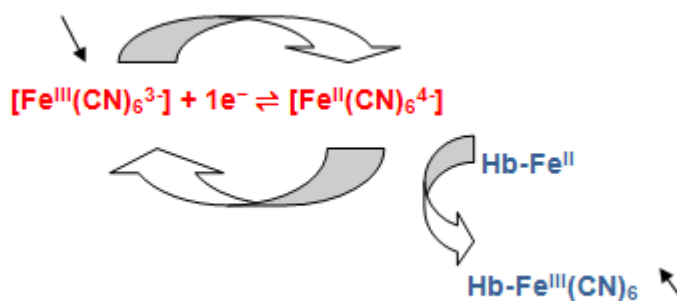
*“Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano”*

*Isaac Newton
Físico y matemático inglés
(1642-1727)*

5.1 Conclusiones

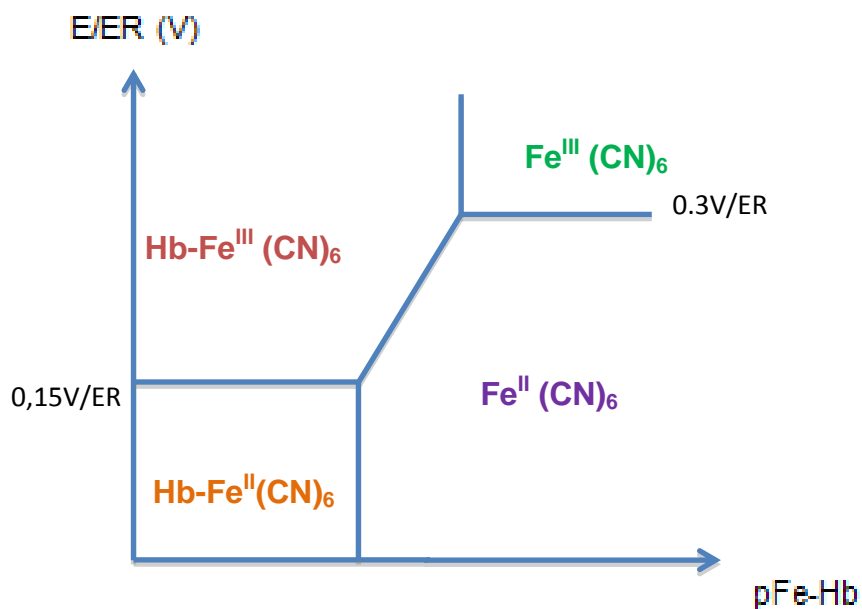
- Algunos parámetros electroquímicos de la electroreducción de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ evaluados por voltamperometría cíclica en condiciones de amortiguamiento en presencia y ausencia de Hb permiten determinar que se trata de un sistema rápido y reversible. De acuerdo con la función de Nicholson y Shain $i_p^a/i_p^c = f(\nu)$, en ausencia de hemoglobina el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ sigue un mecanismo de reacción electroquímico de tipo E_r . En presencia de hemoglobina E_rC_r de tipo catalítico.

Reacción electroquímica principal:



Reacción química acoplada.

El mecanismo anterior se ve apoyado por la variación del potencial a corriente nula en ausencia y presencia de Hb:



El carácter catalítico y la cercanía experimental de sendos E_p del mecanismo propuesto sugiere un complejo poco estable entre el Fe(II) y la Hb, lo que justifica el intervalo limitado de concentraciones de Hb que modifica el perfil voltamperométrico del Fe(III) / Fe(II) en el tiempo ventana estudiado.

- El proceso de electroreducción del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ está controlado por difusión pura.
- Los cambios en D (coeficiente de difusión de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) en presencia de Hb, se debe a un consumo de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ por parte de la hemoglobina a causa de una reacción de complejación.
- La electroreducción del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en medio amortiguado es tipo monoelectrónica, en presencia de Hb, la electroreducción se vuelve de tipo fraccionario.
- A partir de lo predicho por un diagrama de Pourbaix y corroborado experimentalmente por potenciometría, la presencia de Hb en el medio de disolución modifica el potencial redox del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ formando un complejo poco estable.
- La intensidad de corriente aplicada en voltamperometría cíclica es directamente proporcional a la concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina en disolución. Siendo ésta característica importante para mejorar las condiciones de reacción y poder diseñar un dispositivo para cuantificar Hb humana *in situ* en un futuro.

5.2 Expectativas

A pesar de no lograr identificar un mecanismo de reacción electroquímico claro, se establecen las bases para futuros trabajos, dando una importante aportación a la escasa información disponible acerca del tema. Se propone que en un futuro se logre identificar nuevos medios de reacción aún más estables y que con otras técnicas complementarias, permita analizar el papel que juega la proteína durante la reacción entre el hexacianoferrato de potasio (III), estudiar con más detalle el complejo poco estable que se forma e identificar el mecanismo electroquímico más adecuado y que sea reproducible.

Capítulo 6. Bibliografía

*“Si has construido castillos en el aire,
tu trabajo no se pierde;
ahora coloca las bases debajo de ellos”*

*George Bernard Shaw
Escritor Irlandés
(1856-1950).*

6.1 Bibliografía

1. Macedo L. *Determinación electroanalítica de hemoglobina humana*. Tesina de especialización en Bioquímica clínica. Facultad de Química UNAM (2012).
2. Drabkin, D. L. Austin. *Spectrophotometric studies: Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin*". *Biol. Chem.* 112: (1935). 51-65.
3. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3a Edición, Physical and Chemical Data. Vol. 1 CRC Press, (1976).
4. Lehninger A. *Principles of biochemistry*. 4a Edición. New York. (1982). 148-150.
5. Alors R. *Determinación de hemoglobina en el laboratorio*. *Revista Digital de Innovación y Experiencias Educativas*. (2008).
6. Tema de consulta: Hemoglobina Ficha de Seguridad.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h7379?lang=es®ion=MX>. Fecha de consulta: 06 junio 2013.
7. Tema de consulta: Hexacianoferrato de potasio Ficha de Seguridad.
<http://www.rsc.org/MerckIndex/searchresults?CmpdName=hexacyanoferrate%20potassium&CASRegNo=&LitRef=&VetTherUses=&NonMedUses=&Manufact=&FullText=10>. Fecha de consulta: 06 junio 2013.
8. Harris D. *Quantitative Chemical Analysis*. 2a Edición. New York. (1987).
9. García M. A. *Estudio electroanalítico de ferroceno y p- benzoquinona bajo la influencia del nivel de acidez en cinco líquidos iónicos*. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM. México. (2011).
10. Baeza A. y García M. A. Administración de manuales y documentos de la Facultad de Química. UNAM. AMYD *Documento de apoyo: Fundamentos de Electroanalítica* (2011). [en línea]
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC_APOY_FUNDAMENTOS_ELECTROANALITICA_2011_16333.pdf. Fecha de consulta: 30 junio 2013.

11. Castellan, W. *Fisicoquímica*. 2a. Edición. México. Pearson, (1998). 814-815.
12. Skoog, D., Holler, F. y Nieman, C. *Análisis Instrumental*. 5a. Ed.: Editorial McGraw Hill, España (2001). 214-221.
13. Casanova R. *Estudio integral del cloro en desinfectantes hospitalarios*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM (2006).
14. Elschenbroich, C. *Organometallics*. 2a Edición. Germany: VCH, (1992). 495.
15. Kissinger, P. y Heineman, W. *Cyclic Voltammetry*. Journal of Chemical Education, Vol. 60. (1983). 702-706.
16. Allen B. y Foulken, L. *Electrochemical Methods Fundamentals and applications*. U.S.A: Wiley, (2000).
17. DeMars, R. y Shain, I. *Voltammetry with Linearly Varying Potential: Case of Irreversible Waves at Spherical Electrodes*. J. Am. Chem. Soc., Vol. 81. (1959). 2654–2659.
18. Matsuda, H. y Ayabe, Y. *Electrochem*. Vol. 59. (1955). 494.
19. Nicholson, R. y Shain, I. *Theory of Stationary electrode Polarography*. Anal. Chem. Vol. 36, (1964). 706.
20. Nicholson, R. y Shain, I. *Theory of Stationary electrode Polarography for a Chemical Reaction Coupled between Two Charge Transfers*. Anal. Chem. Vol. 2. (1965). 178-190.
21. Mabbot, G. *An Introduction to Cyclic Voltammetry*. Journal of Chemical Education, Vol. 60. (1983). 697-701.
22. Venkat Manohar; George Varguese; Yegnaraman Venkatraman; Phani Lakshminarasimha Kanala, Mathiyarasu Jayaraman. “*Non enzymatic electrochemical method for simultaneous determination of total hemoglobin and glycated hemoglobin*” Patente India. 2010. Número de patente: WO/2010/043985.
23. Devanathan, M. A. y Canagaratna, S.G. *The components of charge in the electrical double layer*. *Electrochimica Acta*, Vol 8. (1963). 7–85.
24. Vassos H. Basil y Ewing W. Galen. *Electroquímica analítica*. Ed. Limusa. (1987). 253-254.