



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA ALBÚMINA
SÉRICA HUMANA CON EL CU(II) Y CON UN COMPUESTO DE
COORDINACIÓN DE CU(II) QUE PRESENTA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ALEJANDRO MARÍN MEDINA

DR. ERNESTO CARRILLO NAVA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2018



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 MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA ALBÚMINA
SÉRICA HUMANA CON EL CU(II) Y CON UN COMPUESTO DE COORDINACIÓN DE
CU(II) QUE PRESENTA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ALEJANDRO MARÍN MEDINA

TUTOR: DR. ERNESTO CARRILLO NAVA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



MÉXICO, CD. MX., 2018

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Miguel Antonio Costas Basín
VOCAL: Dra. Adela Rodríguez Romero
VOCAL: Dr. Felipe de Jesús González Bravo
VOCAL: Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar
SECRETARIO: Dr. Martha Verónica Escárcega Bobadilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:

**Laboratorio 308 de Biofisiología, Departamento de Fisiología,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.**

ASESOR:

DR. ERNESTO CARRILLO NAVA

SUSTENTANTE:

Q. ALEJANDRO MARÍN MEDINA

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, *CONACyT*, por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto de investigación a través de la Beca Nacional de Estudios de Posgrado con clave de registro 603088.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM, *PAPIIT*, por el financiamiento del proyecto titulado “Estudio fisicoquímico de agregados de Casiopeína e interacciones Casiopeína-proteína” (IA207116 RA207116).

Parte de este trabajo fue presentado en:

52° Congreso Mexicano de Química, “*La Química nos une*” del 26 al 29 de septiembre de 2017, en Puerto Vallarta, Jalisco, México. Con dos carteles titulados: “***Estudio de la adsorción de la albúmina sérica humana sobre un electrodo de carbón vítreo mediante ensayos electroquímicos***” y “***Determinación electroquímica del tipo de interacciones que se establecen entre un compuesto de coordinación de Cu(II) con actividad biológica y la proteína albúmina sérica humana***”. Anexo A, A', B y B'.

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido	4
Resumen	7
Hipótesis	8
Objetivos	8
Capítulo 1 Introducción	9
1.1 Características y propiedades de las Casiopeínas.....	10
1.1.1 Casiopeína III-ia.....	13
1.2 La proteína albúmina sérica humana y su unión con el Cu(II).....	14
1.3 Interacción de moléculas pequeñas con biomoléculas.....	15
Capítulo 2 Antecedentes generales	16
2.1 Electroquímica.....	17
2.1.1 Voltamperometría cíclica.....	17
2.1.2 Cronoamperometría.....	23
2.1.3 Voltamperometría diferencial de pulsos.....	28
2.1.4 Impedancia electroquímica.....	32
2.2 Calorimetría.....	34
2.2.1 Calorimetría de titulación isotérmica.....	34
2.2.1.1 Funcionamiento e instrumentación.....	36
2.2.1.2 Condiciones óptimas.....	39
2.2.1.3 Análisis de los datos.....	40
2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido.....	40

2.2.2.1 Instrumentación y experimentos.....	41
2.2.2.2 Registros e información contenida en los experimentos.....	42
2.3 Espectrofotometría ultravioleta y visible.....	43
2.3.1 Relaciones fundamentales.....	44
2.3.2 Instrumentación.....	45
2.3.3 Condiciones de operación.....	46
2.3.4 Aplicaciones de la espectrofotometría ultravioleta y visible y la ley de Lambert Beer Bouguer.....	48
Capítulo 3 Experimental.....	51
3.1 Materiales, disoluciones e instrumentos.....	52
3.2 Técnicas electroquímicas.....	53
3.3 Calorimetría de titulación isotérmica.....	55
3.4 Calorimetría diferencial de barrido.....	56
3.5 Espectrofotometría ultravioleta y visible.....	56
Capítulo 4 Resultados y discusión.....	57
4.1 Estudio del Cu(II) y la Casiopeína III-ia en disoluciones acuosas y su interacción con la proteína albúmina sérica humana.....	58
4.1.1 Electroquímica.....	66
4.1.2 Calorimétrica de titulación isotérmica.....	108
4.1.3. Calorimetría diferencial de barrido.....	113
4.1.4. Espectrofotometría ultravioleta y visible.....	120
Capítulo 5 Conclusiones y expectativas.....	137
5.1 Conclusiones.....	138

5.2 Expectativas.....	139
Capítulo 6 Referencias.....	140
Capítulo 7 Anexos.....	159

Resumen

Mediante el uso de las técnicas de voltamperometría cíclica, cronoamperometría, voltamperometría diferencial de pulsos, espectroscopia de impedancia electroquímica, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido y espectrofotometría ultravioleta y visible, se caracterizaron de manera independiente al Cu(II), la Casiopeína III-ia y con la proteína albúmina sérica humana (ASH) en disolución acuosa de Tris-HCl y KCl a pH = 7.4, que simula condiciones fisiológicas. Se demostró que existe una interacción entre las dos especies de cobre y la ASH con todas las técnicas empleadas, a excepción de la espectrofotometría ultravioleta y visible, donde no se observaron cambios en los espectros de absorción de las disoluciones con especies libres y en mezcla. Con voltamperometría cíclica se determinó que el tipo de interacción entre el Cu(II) y la ASH es de formación de enlaces de coordinación, mientras que para la Casiopeína III-ia sus interacciones con la proteína son de tipo hidrofóbicas/hidrofílicas. Se demostró mediante voltamperometría diferencial de pulsos que los aductos Cu(II)-ASH y Casiopeína-ASH son especies no electroactivas. También se logró determinar que la estequiometría de unión de la ASH con el Cu(II) es 1:1 mientras que para la Casiopeína III-ia es de 2:1, con constantes de formación del orden de 10^4 y 10^9 L mol⁻¹, respectivamente. De los resultados de calorimetría de titulación isotérmica se determinó que la reacción Cu(II)-ASH tiene una estequiometría 1:1, una constante de formación alrededor del orden de 10^6 L mol⁻¹, una entalpía de formación de -25.80 kJ mol⁻¹, entropía de 27.9 J mol⁻¹ K⁻¹ y una energía libre de Gibbs de -34.93 kJ mol⁻¹. Para el sistema Casiopeína-ASH solo se logró obtener un valor de entalpía de reacción de -372.21 kJ mol⁻¹. A partir de los resultados de calorimetría diferencial de barrido se determinó que la interacción del Cu(II) y la Casiopeína III-ia con la ASH disminuye la entalpía de desplegamiento de la proteína como una consecuencia por la afectación a la estructura terciaria de esta.

Hipótesis

La formación de los aductos entre la proteína albúmina sérica humana (ASH), el catión Cu(II) y el compuesto de coordinación Casiopeína III-ia en disolución acuosa a condiciones fisiológica es caracterizable mediante el uso de la electroquímica, calorimetría (titulación isotérmica y diferencial de barrido) y espectrofotometría ultravioleta y visible.

Objetivos

Obtener propiedades fisicoquímicas en disolución acuosa de cada una de las moléculas involucradas en este trabajo por medio de: electroquímica, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido y espectrofotometría ultravioleta y visible. Obtener las propiedades fisicoquímicas de las mezclas en condiciones fisiológicas. Caracterizar las especies Cu(II)-ASH y Casiopeína-ASH obteniendo, por ejemplo, la estequiometría de unión y la constante de formación, si es que existe alguna interacción.

Capítulo 1
Introducción

1.1 Características y propiedades de las Casiopeínas

Las Casiopeínas son un grupo de compuestos de coordinación con un núcleo metálico de Cu(II), diseñados para ser utilizados como agentes quimioterapéuticos menos tóxicos y más eficientes^[1 - 4]. Estos compuestos fueron diseñados, sintetizados y patentados bajo el nombre genérico de Casiopeínas en el laboratorio de Química Inorgánica y Medicinal de la Facultad de Química de la UNAM^[5 - 7]. El desarrollo de estos compuestos se hizo en base al razonamiento de que los compuestos de cobre, a diferencia de otras terapias basadas en metales, se metabolizan más fácilmente^[8], esta propiedad disminuye la incidencia de efectos secundarios encontrados en otras quimioterapias^[9]. Esto porque el cobre es un metal que se encuentre en el cuerpo humano de manera esencial, realizando funciones biológicas como reacciones redox en las que el cobre reacciona directamente con el oxígeno molecular o H₂O₂ para producir radicales libres^[10, 11]. Puede desplazar a otros iones metálicos, participar en la peroxidación lipídica y/o unirse directamente al ADN y ARN^[12, 13]. La toxicidad del cobre proviene de su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, el cuerpo tiene un mecanismo natural para su eliminación disminuyendo así su toxicidad. Otra ventaja que tiene el uso de fármacos basados en Cu(II) es que este al ser un metal abundante en el planeta es más barato que algunos de los metales como: Sn (IV), Ti (IV), Au (I), Ru (II), Ru (III), Pd (II), Rh (I) utilizados comúnmente como base para fármacos^[14 - 28] lo cual generaría un gasto menor de producción^[29].

A lo largo de su historia las Casiopeínas han sido sometidas a diversas caracterizaciones estructurales^[30], determinación de constantes de formación, estabilidad en disolución^[31, 32], estudios teóricos^[29, 33], parámetros electroquímicos^[29] y mecanismos de reacción anticancerígenos^[34, 35]. Donde las pruebas para la evaluación de la actividad de las Casiopeínas mediante modelos biológicos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que presentan actividad citotóxica, antineoplásica y citostática^[36, 37]. Existen también estudios en células CH1 donde se demostró muerte celular por apoptosis a través del daño en el ADN^[38], mientras que en células de glioma C6 se observó inhibición de la proliferación celular, un

incremento en la producción de especie reactivas de oxígeno y la inducción de apoptosis^[39], estudios de hemotoxicidad en ratas^[40], activación de especies reactivas de oxígeno^[41], disfunción mitocondrial^[42], la inhibición de la respiración celular y de la síntesis de ATP^[9], siendo esta dependiente de la concentración por lo que se han establecido métodos de cuantificación cromatográficos para la detención de Casiopeínas^[43, 44]. Por otra parte, en cuanto a la interacción con biomoléculas las Casiopeínas se han estudiado con el ADN^[35], adenina, guanina, citosina y tirosina, la substitución del ligante acetilacetonato por metionina (aminoácido esencial)^[30] y con la albúmina humana mediante dicróismo circular^[45]. El objetivo del estudio de interacciones específicas de Casiopeínas (y fármacos en general) con dianas biológicas importantes tales como proteínas, ADN o ARN es guiar un desarrollo inteligente de medicamentos que tengan una alta especificidad de acción y así reducir efectos secundarios indeseables. Aunque se presentan solo algunos de los estudios más importantes e interesantes realizados a estos compuestos para conocer su actividad biológica y el mecanismo con que actúan, se puede notar la gran cantidad de conocimiento que se ha generado.

Estructuralmente las Casiopeínas son compuestos de coordinación mixtos que además del átomo de Cu(II) como núcleo metálico en su estructura tienen dos ligantes bidentados con átomos donadores de nitrógeno y oxígeno, los cuales tienen como fórmula general $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ y $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$ donde (N-N) = X-fenantrolina o X-bipiridina, (O-O) = acetilacetonato y (N-O) = α -aminoacidato o péptido. Por lo que el átomo de cobre se encuentra formando cinco enlaces de coordinación, un par con cada uno de los ligantes bidentados y uno extra con una molécula de agua. Geométricamente las Casiopeínas se presentan como una pirámide de base cuadrada con la molécula de agua como cúspide de la pirámide. A lo largo del tiempo y por la versatilidad de los ligantes para tener sustituyentes actualmente existen más de cien compuestos diferentes de Casiopeínas, los cuales están englobados en diez familias que se muestran en la tabla 1.1 y las estructuras generales de estos compuestos se presentan en la figura 1.1. La Casiopeína que se utilizó para el desarrollo de este proyecto pertenece a la familia III y se describe en el siguiente apartado.

Tabla 1.1: Clasificación de las Casiopeínas (adaptada)^[5].

Clave	Formula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O) ^a H ₂ O]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína III a	[Cu(N-N) ^b (acetilacetato)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína III s	[Cu(N-N)(salicilaldehidato)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5,R-1,10-fenantrolina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)H ₂ O]NO ₃
Casiopeína X	[Cu(N-N)(péptido)H ₂ O]NO ₃

^a N-O = α-aminoácido y ^b N-N = R-1,10-fenantrolina o R-2,2'-bipiridina.

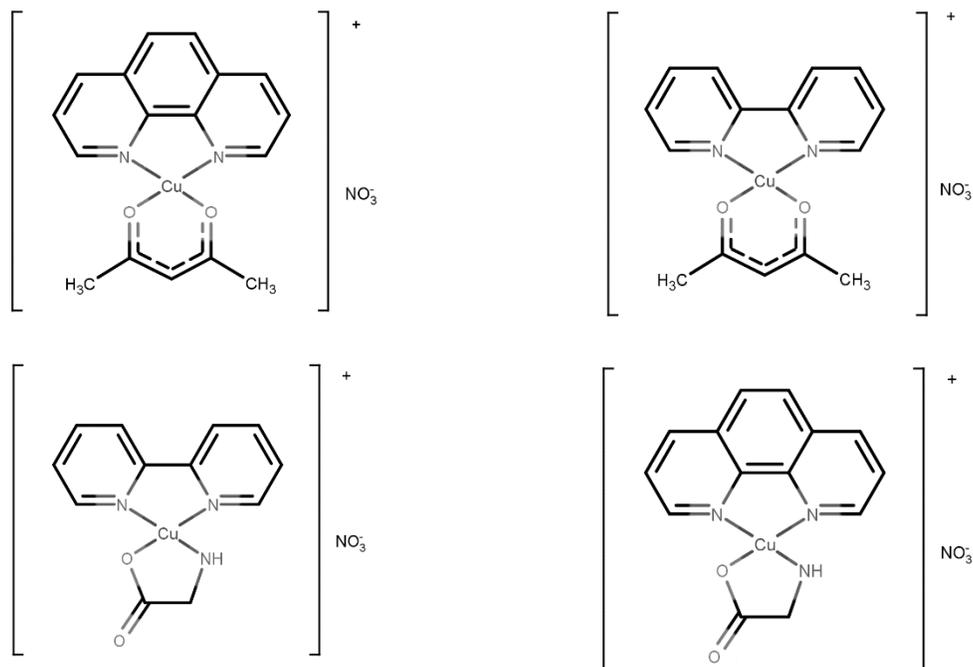


Figura 1.1. Estructuras generales de las Casiopeínas más comunes. Todas las estructuras presentan una molécula de agua coordinada con el cobre, la cual no se muestra en estas estructuras. Físicamente todas las Casiopeínas se presentan como polvos suaves con distintas tonalidades de azul.

1.1.1 Casiopeína III-ia

El compuesto elegido para el desarrollo de este proyecto es la Casiopeína III-ia (figura 1.2), es uno de los compuestos del grupo de estos metalofármacos más prometedor para ser usado como fármaco quimioterapéutico o agente de diagnóstico y como consecuencia es uno de los más estudiados. Inclusive, actualmente se encuentra en la fase 1 de ensayos clínicos. Aunque su mecanismo de acción a nivel molecular no se conoce con gran detalle, varios resultados experimentales establecen dos factores principales para la inducción citotóxica sobre las células tumorales humanas: I) la generación de especies reactivas de oxígeno y II) la interacción directa con el ADN^[35, 46].

Estructuralmente esta Casiopeína tiene como ligantes una unidad de acetilacetionato, una molécula de agua y (como variante de lo que sería la familia III a de estos compuestos) una molécula de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina^[30].

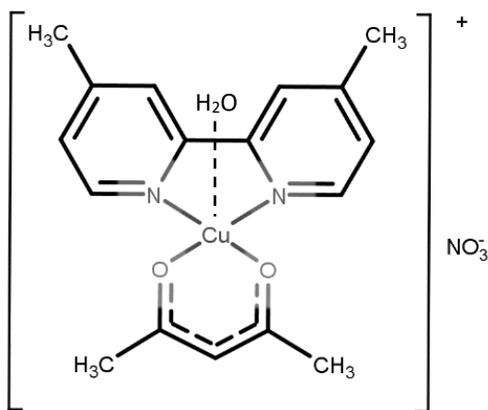


Figura 1.2. Compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{acetilacetionato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína III-ia).

1.2 La proteína albúmina sérica humana

La proteína albúmina sérica humana (figura 1.3) es la proteína más abundante en el plasma de la sangre humana con una concentración de entre 35 - 50 g L⁻¹ y se sintetizada en el hígado. Posee 585 aminoácidos en su estructura primaria y tiene un peso molecular alrededor de 66,500 g mol⁻¹. Es una proteína monomérica con tres dominios (I, II, II). Cada dominio está formado por dos subdominios helicoidales (nombrados A y B) conectados por secciones de residuos de aminoácidos sin estructura (random coil). Presenta 67% de α hélice en su estructura secundaria y nada de hoja β plegada. El 40% de la albúmina permanece en el plasma mientras que el 60% restante se encuentra en el espacio extravascular^[47, 48].

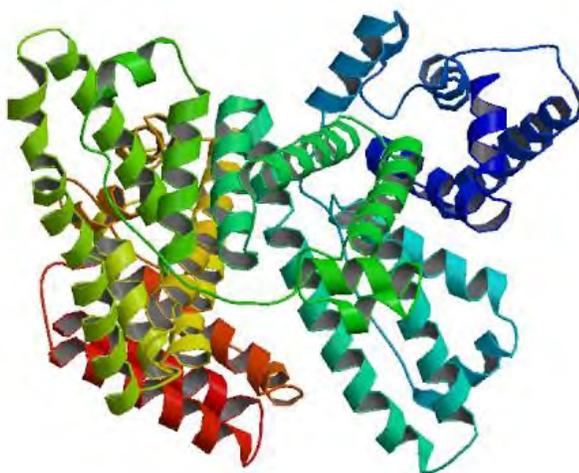


Figura 1.3. Estructura cristalina de la albúmina sérica humana, PDB 1AO6.

Las principales funciones de esta proteína son: mantener la presión oncótica y transportar moléculas como ácidos grasos, ácidos biliares, vitaminas D y B12, hormonas y las más importantes para este trabajo las que contienen cationes metálicos como Mn, Zn, Au, Ni y Cu. Demostrando que tiene sitios activos específicos para estos dos últimos metales. Además, se ha evidenciado la extraordinaria capacidad de unión que tiene esta proteína con diversos compuestos orgánicos y de coordinación sintetizados bajo diseño^[47 - 49].

El cobre en estado de oxidación 2+, está ampliamente distribuido en los tejidos corporales y su papel natural en la fisiología humana, su toxicidad, las interacciones con diversos componentes y la participación en diferentes enfermedades está bien estudiado^[50 - 53]. La fracción de cobre que no es transportada por la ceruloplasmina en el plasma sanguíneo se une a la albúmina sérica humana (ASH), que funciona como una proteína de transporte de cobre *in vivo*^[54, 55]. El sitio fisiológico de unión para el ion Cu^{2+} en la estructura de la ASH está situado en el extremo amino terminal^[52 - 54]. Este sitio de unión se compone de los tres primeros residuos de aminoácidos de la secuencia de la ASH, ácido aspártico-alanina-histidina, y el compuesto de coordinación resultante con geometría de cuadrado plano presenta un modo de coordinación único con los nitrógenos de la amida desprotonados de los residuos alanina e histidina, además del amino terminal de la amina y su imidazo^[56, 57]. También se ha reportado que el carboxilo de la cadena lateral del residuo aspártico (amino terminal) está implicado en la quelación de iones Cu^{2+} por la ASH^[58].

La proteína albúmina sérica humana fue elegida como diana biológica para el desarrollo de este proyecto puesto que cuenta con características de unión y transporte muy interesantes, y al ser la proteína predominante en el plasma de la sangre humana la convierte en una molécula con la cual la Casiopeína estará en contacto en el momento en que sea administrada al paciente.

1.3 Interacción de moléculas pequeñas con biomoléculas

Las interacciones entre moléculas pequeñas y biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos han despertado gran interés en los últimos años. El estudio de la interacción supramolecular entre ellos es útil para comprender las estructuras y funciones de las biomoléculas. Por lo tanto, los estudios del mecanismo de acción y la tendencia en las afinidades de unión de las proteínas son importantes para diseñar medicamentos más poderosos y selectivos. Existen varios tipos de interacciones asociadas con fármacos que se unen a biomoléculas. Estos incluyen: intercalación, unión por ranura no covalente, enlace covalente, reticulación, enlace de coordinación, hidrofóbicas y electrostáticas^[59, 60].

Capítulo 2
Antecedentes generales

2.1 Electroquímica

2.1.1 Voltamperometría cíclica

En estudios cinéticos para la determinación de mecanismos de reacción una de las técnicas electroquímicas más utilizada es la voltamperometría cíclica, puesto que brinda información sobre el comportamiento oxido-reducción de las especies y de las reacciones químicas involucradas en la determinación de parámetros termodinámicos^[61]. Esta técnica involucra la variación lineal del potencial a través del tiempo, se realiza un barrido de potencial a velocidad constante, también se puede realizar un barrido de corriente aunque éste no es muy común. En la figura 2.1 se muestra el programa de perturbación y la respuesta obtenida para la técnica antes descrita.

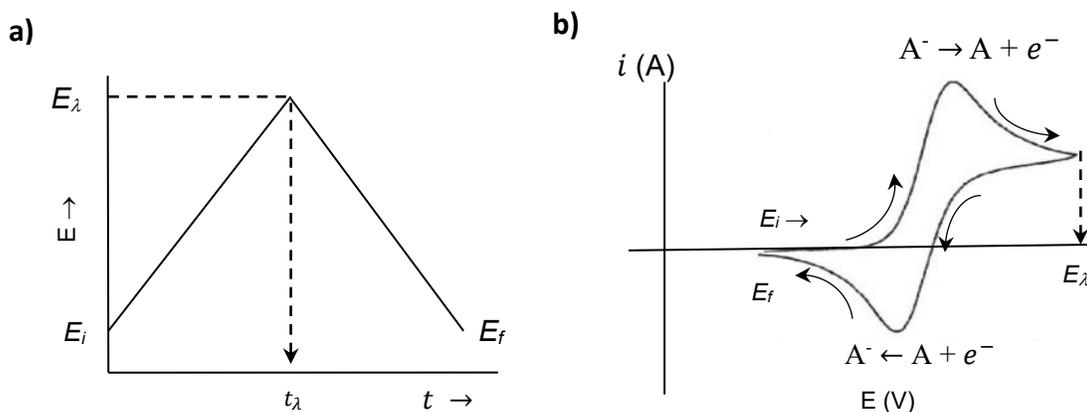


Figura 2.1. a) Perturbación: barrido de potencial cíclico b) Resultado: voltamperograma cíclico, curva $i = f(E)$, de una especie A^- que se oxida y reduce de manera monoelectrónica.

Como se ve en la figura anterior la perturbación es de tipo triangular y puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia sobre un electrodo estático y a régimen de difusión pura. El potencial donde se invierte el barrido recibe el nombre de potencial de inversión (E_λ). El potencial inicial (E_i) y potencial final (E_f) pueden o suelen ser los mismos produciendo así un programa de perturbación triangular. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado, es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controlada por difusión de una o varias

especies. Dependiendo del tipo de estudio la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva. Cuando se utiliza la voltamperometría cíclica para estudiar un sistema por primera vez, es usual comenzar realizando pruebas cualitativas con la finalidad de conocer el mismo para luego seguir con los experimentos semicuantitativos y culminar con los cuantitativos, para así obtener los parámetros cinéticos de interés^[62]. En un análisis cuantitativo se acostumbra trazar voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido e intervalos de potencial. La técnica permite electrolizar una especie y al invertir el potencial corroborar la formación de su par redox, de esta manera es como se plantean los mecanismos de reacción asociados. Al variar las velocidades de barrido se puede estudiar la cinética asociada al proceso o registrar la formación de especies intermedias en el proceso.

Comúnmente, en los voltamperogramas hay una cierta cantidad de picos que por medio de la variación de las velocidades de barrido y los intervalos de potencial se puede observar como estos se mantienen o desaparecen. Notando las diferencias que existen entre el primer y los subsecuentes barridos, al mismo tiempo que la velocidad de barrido y la amplitud del pico explica el papel de adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas dentro de proceso en estudio. Si se analiza una muestra con dos o más analitos y su comportamiento es distinto, el voltamperograma obtenido será la suma de los voltamperogramas individuales, aunque no será así si el comportamiento es particular.

En voltamperometría cíclica se estudian primero las reacciones de cinética rápida y que además son reversibles, dado que son las más simples, reacciones tipo la ecuación 2.1.



La figura 2.2 muestra los parámetros que pueden arrojar información importante acerca del proceso electroquímico. 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, $E_{1/2}$ potencial de media onda y $E_{p/2}$ potencial a la mitad del pico.

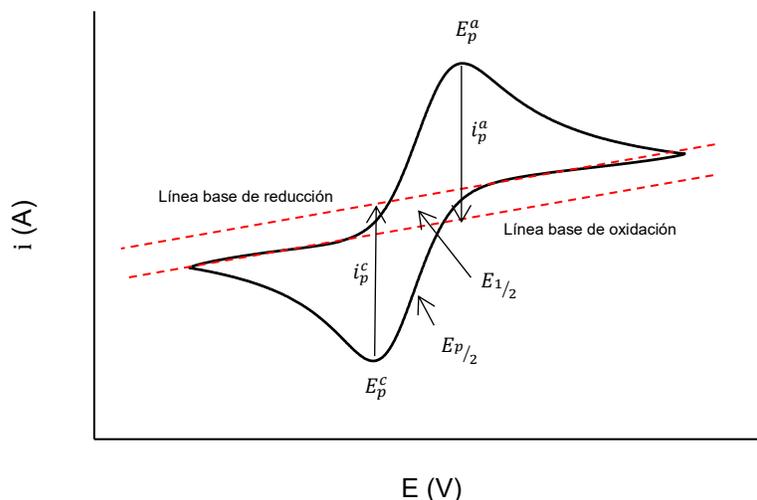


Figura 2.2. Parámetros en un voltamperograma cíclico.

Un método para medir la i_p implica la extrapolación de la línea base de corriente como se muestra en la figura anterior. El establecer de manera correcta las líneas base es esencial para una medición precisa de la corriente en cada pico. Esto no es siempre fácil, en particular para sistemas complicados. Aunque los softwares actuales que controlan los potenciostatos tienen la posibilidad de arrojar los valores de estos parámetros directamente.

La proporcionalidad entre la respuesta de corriente de pico para un sistema reversible obtenida del barrido del primer ciclo, la intensidad de corriente, la concentración y la velocidad de barrido es descrita por la ecuación de Randles-Sevcik^[61].

$$i_p = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2.2)$$

donde:

i_p : intensidad de corriente de pico.

n : número de electrones transferidos en la reacción electroquímica.

A : área superficial del electrodo.

D : coeficiente de difusión de la especie electroactiva.

C : concentración de la especie electroactiva en el seno de la disolución.

v : velocidad de barrido.

Para sistemas reversibles evaluar la función $i_p = f(v^{1/2})$ permite obtener información importante dado que su perfil es el de una línea recta. De la pendiente se puede obtener el coeficiente de difusión de la especie electroactiva y el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica. Mientras mayor sea la velocidad de barrido mayor será la corriente de pico, mientras el sistema siga siendo reversible. Por otro lado, si la especie electroactiva se está depositando en la superficie del electrodo de trabajo la i_p es directamente proporcional a la v . Si se mantiene fija la velocidad de barrido, a diferentes concentraciones de analito, la corriente de pico aumenta de manera proporcional con la concentración y con el número de electrones que intercambie el proceso electroquímico elevado a la 3/2.

Para sistemas reversibles el cociente de las señales de corriente para el pico anódico y pico catódico, a diversas concentraciones o velocidades de barrido, debe cumplir $i_p^c/i_p^a = 1$ para la reacción de electrorreducción y $i_p^a/i_p^c = 1$ para la electrooxidación, donde la corriente debida a la especie que se genera al electrodo se coloca en el numerador. Este criterio se convierte en una manera rápida de verificar la reversibilidad química de un sistema.

La ecuación de Randles-Sevcik para sistemas irreversibles se ve modificada en términos cinéticos:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) \alpha^{1/2} n A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (\text{sí la disolución está a } 25^\circ\text{C}) \quad (2.3)$$

Un par redox en que ambas especies intercambian electrones rápidamente con el electrodo de trabajo se denomina par electroquímicamente reversible. El potencial normal condicional ($E^{0'}$) para este tipo de sistemas se aproxima al potencial de media onda ($E_{1/2}$) y este está dado por la siguiente relación.

$$E^{0'} \approx E_{1/2} = \frac{E_p^c + E_p^a}{2} \quad (2.4)$$

La ecuación anterior se cumple si los coeficientes de difusión de las especies electroactivas son los suficientemente similares para eliminar el término logarítmico de la siguiente ecuación.

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{Red}^{1/2}}{D_{Ox}^{1/2}} \right) \quad (2.5)$$

El número de electrones transferidos en la reacción al electrodo para este tipo de sistemas se puede determinar;

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{2.22 RT}{nF} = \frac{0.0569 V}{n} \quad (\text{sí la disolución está a } 25^\circ\text{C}) \quad (2.6)$$

La ecuación anterior permite determinar el potencial de medio pico ($E_{p/2}$), con el cual se puede estimar mejor el punto medio entre los picos del voltamperograma; el potencial correspondiente para $i_{p/2}$ [63]. En la siguiente ecuación, por convención, el signo positivo será para un proceso de oxidación, mientras que el signo negativo para un proceso de reducción.

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm 1.09 \left(\frac{RT}{nF} \right) = E_{1/2} \pm \frac{0.028 V}{n} \quad (\text{sí la solución está a } 25^\circ\text{C}) \quad (2.7)$$

Para un sistema reversible el E_p es independiente de la velocidad de barrido, mientras que la transferencia lenta de electrones en la superficie del electrodo, irreversibilidad, causa que la separación entre los picos aumente haciendo a estos sistemas dependientes de la velocidad de barrido lo cual se describe en la siguiente ecuación [61].

$$E_p^c = E^{0'} - \left(\frac{RT}{\alpha F n} \right) \left[0.780 + \ln \left(\frac{D^{1/2}}{k^c} \right) + \ln \left(\frac{\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (2.8)$$

Por lo que una gráfica de $E_p = f[\ln(v)]$, para el pico anódico o catódico, también genera una línea recta cuya ordenada al origen es igual al valor de $E^{0'}$ y la pendiente se desplaza, para una reducción, $\frac{1.15RT}{\alpha F n}$ en dirección negativa por cada aumento de diez veces en la velocidad de barrido. Se observa también que el potencial de pico es una variable que no depende de la concentración del analito.

Una aproximación para determinar α se basa en la diferencia entre el potencial de pico y el potencial a la mitad de la altura del pico.

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{1.857RT}{\alpha Fn} \quad (2.9)$$

Para un proceso irreversible más complicado que la reacción de un solo paso de un electrón, generalmente no es factible derivar las ecuaciones que describan la relación de corriente-potencial. En el caso general, el enfoque más práctico es comparar comportamiento con las predicciones de simulaciones^[61, 64].

Existen en la literatura varias funciones para la determinación de la constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones, k° . Una de las metodologías más empleadas es la propuesta por Nicholson y Shain^[65, 66]. Este método se basa en la determinación del parámetro adimensional Ψ que se relaciona con k° con las siguientes expresiones.

$$\Psi = k^\circ x v^{-1/2} \quad (2.10)$$

$$x = \left[\frac{n\pi FD}{RT} \right]^{-1/2} \quad (2.11)$$

donde:

El valor de la función Ψ puede evaluarse a partir de los voltamperogramas experimentales si se conoce la diferencia de potenciales de pico (ΔE_p) para una serie de voltamperogramas a distintas velocidades de barrido. De acuerdo a Lavagnini y colaboradores es posible determinar el valor de Ψ utilizando las siguientes ecuaciones empíricas dependiendo de los intervalos de (ΔE_p) que presenten los voltamperogramas^[67].

$$\Psi = \frac{-0.6288 + 0.0021(n\Delta E_p)}{1 - 0.017(n\Delta E_p)} \quad \text{para } \Delta E_p \text{ hasta } 0.2 \text{ V} \quad (2.12)$$

$$\Psi = 2.18 \left(\frac{\beta}{\pi} \right)^{1/2} e^{\frac{\beta^2 F}{RT} n \Delta E_p} \quad \text{para de } 0.2 \text{ V} < \Delta E_p < 0.5 \text{ V} \quad (2.13)$$

También existe la posibilidad de establecer que tipo de mecanismo de reacción se estaba llevando a cabo simplemente al graficar parámetros voltamperométricos en función de la velocidad de barrido^[65, 66]. Así como fijar si el proceso que se está llevando a cabo en el electrodo es de tipo reversible, cuasirreversible o irreversible^[68].

2.1.2 Cronoamperometría

La figura 2.3 muestra el programa de perturbación y la respuesta obtenida para un experimento básico de cronoamperometría donde se realiza una imposición de un potencial constante en función del tiempo^[61].

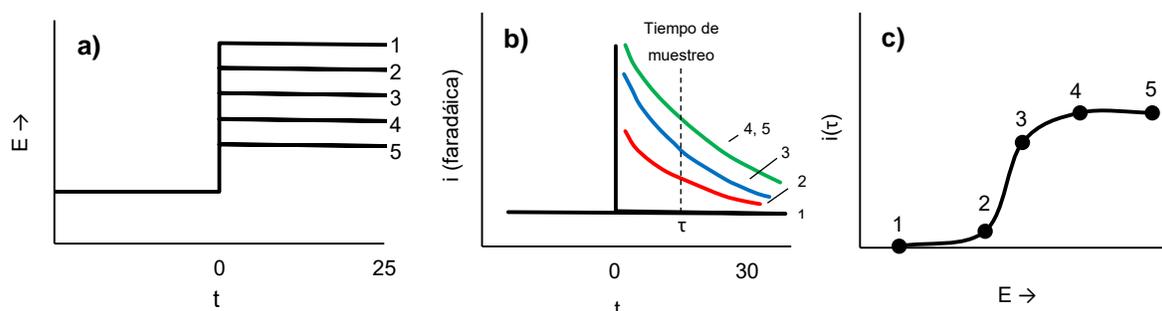


Figura 2.3. a) Programa de perturbación cronoamperométrico $E_{imp} = f(t)$, b) patrón de respuesta $i_{far} = f(t)$, y c) procesamiento de datos $i_{difusión} = f(E_t)$. Adaptada^[61].

Los efectos de la imposición del potencial ocurren en la interfase conductor/disolución donde está contenida la especie electroactiva a régimen de difusión pura. Por ejemplo, en el caso de tener a Ox en la disolución experimentalmente iniciamos la aplicación del potencial E_1 donde no ocurra la reacción electroquímica, para después aplicar un potencial cerca de E_5 donde la cinética de electroreducción de Ox es tan rápida que este no puede coexistir al electrodo. Por lo tanto su concentración en la superficie del electrodo descenderá a casi cero. Se dice entonces que a este potencial aplicado durante un tiempo determinado el transporte de masa está gobernado únicamente por difusión.

Esta condición requiere de corrientes relativamente grandes ya que el proceso ocurre instantáneamente. La corriente fluye de manera subsecuente para mantener a la especie Ox reducida en la superficie del electrodo. Creando entonces un gradiente de concentración en la superficie del electrodo la cual favorece que llegue

de nuevo Ox desde el seno de la disolución hasta el electrodo para ser reducido. Este flujo provoca un incremento de la zona donde no hay Ox , dado que la concentración disminuye con el tiempo al igual que la corriente. La medida de la respuesta de este experimento puede describirse mediante la ecuación de Cottrell para un electrodo en forma de disco^[61, 69].

$$i(t) = \frac{nFAC_{Ox}D_{Ox}^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad (2.14)$$

Se puede ejecutar una serie de experimentos como el descrito anteriormente para el mismo sistema, la condición es regresar al sistema a su estado inicial agitando un poco la disolución y aplicando un potencial inverso. De igual manera se selecciona un potencial donde no ocurre la reacción electroquímica y se va aumentando el potencial entre cada experimento como lo muestra la figura 2.3 a), donde el E_1 es el potencial donde la especie no es electroactiva y la consecuencia es una respuesta de corriente faradaica nula. Por otro lado E_2 y E_3 son potenciales donde la especie es electrorreducida, pero no a tal grado que su concentración al electrodo sea cero. Los valores de potencial en E_4 y E_5 son a los que se cumple que la reacción electroquímica este limitada por transporte de masa, en específico difusión, ya que Ox se electrorreducirá tan rápido como la difusión lo lleve hacia la superficie del electrodo, como consecuencia la corriente también estará limitada por este factor y obedecerá la ecuación 2.14.

Una vez que el potencial ha alcanzado estos valores límites la corriente no se ve afectada por cambios de potencial sin embargo, para los potencial E_2 y E_3 puede existir una concentración de Ox al electrodo y los valores de corriente serán menores que para los potenciales aplicados en E_4 y E_5 . Si se muestrea una corriente a un tiempo determinado, t , se obtiene un registro $i_{dif} = f(E_t)$ llamado voltamperograma con muestreo cronoamperométrico^[61, 69, 70].

Este tipo de voltamperograma permite obtener información interesante al llevar la ecuación de Cottrell a una aproximación en un estado en donde la concentración de la especie electroactiva al electrodo se comporta de manera lineal cuando $t \geq \tau$.

$$i = -nK_{Ox}[C_{Ox}^* - C_{Ox}^S] \quad (2.15)$$

$$i = -nK_{Red}[C_{Red}^* - C_{Red}^S] \quad (2.16)$$

donde:

n : número de electrones transferidos durante la reacción electroquímica.

K_{Ox} y K_{Red} : constantes de proporcionalidad según los parámetros de Cottrell.

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

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

C_{Ox}^* : concentración del oxidante en el seno de la disolución.

C_{Red}^* : concentración del reductor en el seno de la disolución.

Para tiempos suficientemente largos $C^S \approx 0$, entonces la corriente está limitada por difusión:

$$i = -nK_{Ox}C_{Ox}^* \quad (2.17)$$

$$i = -nK_{Red}C_{Red}^* \quad (2.18)$$

Si se substituye sobre la ecuación de Nernst, 2.18, se obtiene la siguiente expresión.

$$E = E^0 + \frac{0.06V}{n} \log \frac{i(\tau) - i_{dif,Ox}}{i_{dif,Red} - i(\tau)} + \frac{0.06V}{n} \log \frac{K_{Red}}{K_{Ox}} \quad (2.19)$$

Al cumplirse que $D_{Ox} \cong D_{Red}$ se obtiene alguno de los siguientes casos:

- Si se tiene una disolución que solo contiene a la especie oxidante el análisis voltamperométrico con muestreo cronoamperométrico se ajusta a la siguiente expresión.

$$E = E^0 + \frac{0.06V}{\alpha_n n} \log \frac{i_{dif,Ox} - i(\tau)}{i(\tau)} \quad (2.20)$$

- Mientras que para una disolución que únicamente contenga a la especie reductora la expresión queda dada por.

$$E = E^0 + \frac{0.06V}{\alpha_n n} \log \frac{i(\tau)}{i_{dif,Red} - i(\tau)} \quad (2.21)$$

Donde $i(\tau)$ es la corriente muestreada a un tiempo t y a un potencial donde la corriente no está limitada únicamente por difusión. Ambas ecuaciones reciben el nombre de Heyrovský-Ilkovic, en cada una se introduce el término α_n , de carácter adimensional, el cual permite evaluar la reversibilidad de los sistemas electroactivos mediante un valor de los electrones aparentemente intercambiados en un proceso electroquímico^[61]. Para sistemas completamente irreversibles y rápidos se cumple que $\alpha_n = 1$. La función $E = f(\ln(\frac{i(\tau) - i_{Ox}}{i_{Red} - i(\tau)}))$ presenta el perfil de una línea recta y se utiliza como criterio de reversibilidad ya que la pendiente se ajusta al valor $m = \frac{RT}{\alpha_n n F}$.

La cronoamperometría también es una herramienta útil para el estudio de especies electroactivas que se adsorben en la superficie del electrodo de trabajo. La clave de esto es que es posible distinguir entre la carga de la adsorción de la especie sobre el electrodo y la carga de electrólisis de la especie en disolución. Esta distinción es posible porque la especie que se adsorbe lo hace inmediatamente después de aplicar el potencial, mientras que la especie en disolución tiene que difundir hacia el electrodo para reaccionar^[68, 69].

La carga total (Q_{total}) medida está dada por tres fuentes: la carga de la doble capa eléctrica (Q_{dc}), la carga de especies adsorbidas por electrólisis (Q_{ads}) y la carga por electrólisis en disolución (Q_{elec}).

$$Q_{total} = Q_{dc} + Q_{ads} + Q_{elec} \quad (2.22)$$

Las cuales se pueden escribir como:

$$Q_{total} = Q_{dc} + nF\Gamma_{red} + 2nFAC^* \left(\frac{D_{red}t}{\pi}\right)^{1/2} \quad (2.23)$$

donde:

n : número de electrones transferidos durante la reacción electroquímica.

F : constante de Faraday.

Γ_{red} : concentración del reductor adsorbida, mol cm⁻².

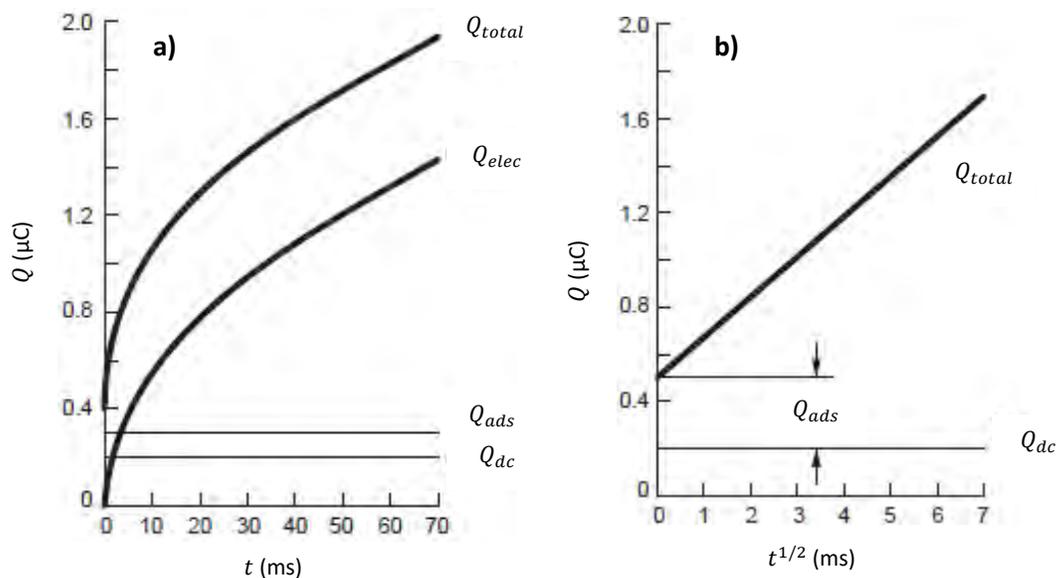
A : superficie del electrodo.

C^* : concentración del reductor en el seno de la disolución.

D_{red} : coeficiente de difusión del reductor.

t : tiempo.

Las contribuciones de cada parte están descritas en la figura 2.4 a). La Q_{elec} tiene una dependencia con el $t^{1/2}$ porque la especie electroactiva es transportada a la superficie del electrodo por difusión. Dado que la especie adsorbida se electroliza instantáneamente, no depende del tiempo, como lo muestra la contribución constante de Q_{ads} en la figura 2.4 a). La carga de la doble capa Q_{dc} también es esencialmente instantánea (suponiendo que el retraso de tiempo es corto), por lo que Q_{dc} también es independiente del tiempo y muestra una contribución constante como en la figura 2.4 a).



2.4. Carga como función del tiempo a) y carga como función del tiempo^{1/2} b) respuestas para el sistema con la disolución y la especie adsorbida. Se muestran la Q_{total} y los sistemas individuales^[69].

En una gráfica de Anson (Q como función del $t^{1/2}$), figura 2.4 b), la intersección con el eje está determinada por las contribuciones independientes del tiempo, es decir, la suma de Q_{ads} y Q_{dc} . Por lo tanto, Q_{ads} puede calcularse restando Q_{dc} de la intersección. Una forma para calcular Q_{ads} es realizar el experimento en el electrolito de soporte solo y después con el analito. Sin embargo, este enfoque supone que Q_{dc} es el mismo en presencia y ausencia de las especies adsorbidas, pero esta suposición no es necesariamente válida^[68, 69].

2.1.3 Voltamperometría diferencial de pulsos

En la voltamperometría diferencial de pulsos en contraste con las técnicas electroquímicas potenciodinámicas, donde se aplica un barrido de potencial lineal (voltamperometría lineal) o un barrido cíclico (voltamperometría cíclica), se aplica una rampa de potencial con las siguientes características^[61, 71 – 74]:

- La aplicación de un potencial constante en un intervalo de tiempo considerado largo [$0.5 \leq t \text{ (s)} \leq 4.0$].
- Transcurrido este tiempo se aplica un nuevo pulso de potencial superior en valor absoluto al anterior [$10 \leq \Delta E \text{ (mV)} \leq 100$] pero, en un intervalo de tiempo menor [$5 \leq t \text{ (ms)} \leq 100$].
- Para concluir se aplica un tercer pulso de potencial menor que el segundo y mayor que el primero con un tiempo de imposición igual a este para poder comenzar un nuevo ciclo.

Esta técnica está diseñada para minimizar el aporte de la corriente capacitiva, por lo que el muestreo de la corriente se hace antes de la aplicación del pulso y justo antes del final del segundo pulso donde el aporte de la corriente capacitiva es prácticamente despreciable. Este diseño experimental permite aumentar el límite de detección, puesto que éste depende de la relación entre la corriente faradaica y la corriente capacitiva, la sensibilidad y el nivel de ruido de la corriente capacitiva^[71]. Con esta técnica se logran alcanzar, sin mayor problema, límites de detección de $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$, mientras que con las voltamperometrías lineal o cíclica se pueden alcanzar únicamente límites de entre 10 y $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (en ocasiones asistidas por

técnicas de redisolución o desorción sobre el electrodo de trabajo), por lo que la voltamperometría diferencial de pulsos es una técnica idónea para estudiar proteínas que son difíciles de obtener y/o costosas^[75, 76].

En la figura 2.5 a) se muestra el programa de perturbación de la voltamperometría diferencial de pulsos, b) el muestreo de la corriente y c) el tipo de registros obtenidos. Se puede observar en la figura 2.5 a) que el potencial base aplicado se incrementa en forma de escalera y el pulso, de altura constante, es mucho más pequeño que el periodo del potencial base que forma la escalera. Como ya se mencionó anteriormente la corriente se muestrea dos veces, marcadas en la figura 2.15 b) como 1 y 2 a un tiempo τ' y τ . De estas corrientes se hace una diferencia $i(2) - i(1)$ la cual se grafica frente al potencial de escalera conduciendo a una representación en forma de pico como la que se observa en la figura 2.5 c). El cual se puede separar en tres zonas que describen los distintos procesos de una reacción electroquímica. I: donde no existe reacción electroquímica porque el potencial aplicado está alejado del E° de la especie electroactiva generando un mínimo aumento en la corriente. II: cuando el potencial aplicado se acerca al E° favoreciendo la electrólisis y observando como consecuencia un cambio abrupto en el valor absoluto de la corriente medida. III: al llegar al punto donde el potencial aplicado es suficiente para que la reacción electroquímica esté limitada únicamente por el transporte de masa, la corriente generada es prácticamente constante haciendo que la Δi sea prácticamente cero, observando un cambio en el valor de la pendiente de la curva. Por lo tanto al hacer uso de esta técnica inicialmente se debe aplicar un potencial base donde no haya reacción electroquímica del analito, disolvente, electrodo de trabajo y/o electrolito soporte de forma que la corriente registrada sea debida a la carga de la doble capa eléctrica del sistema. Después del tiempo τ' el potencial es cambiado abruptamente hacia un valor donde se presenta una reacción electroquímica de manera que la corriente observada va a estar dada por aportes faradaicos como capacitivos. A pesar de ello, durante el tiempo que dura el pulso, la corriente capacitiva decae de forma muy rápida en comparación con la corriente debida a una reacción electroquímica^[71 - 74].

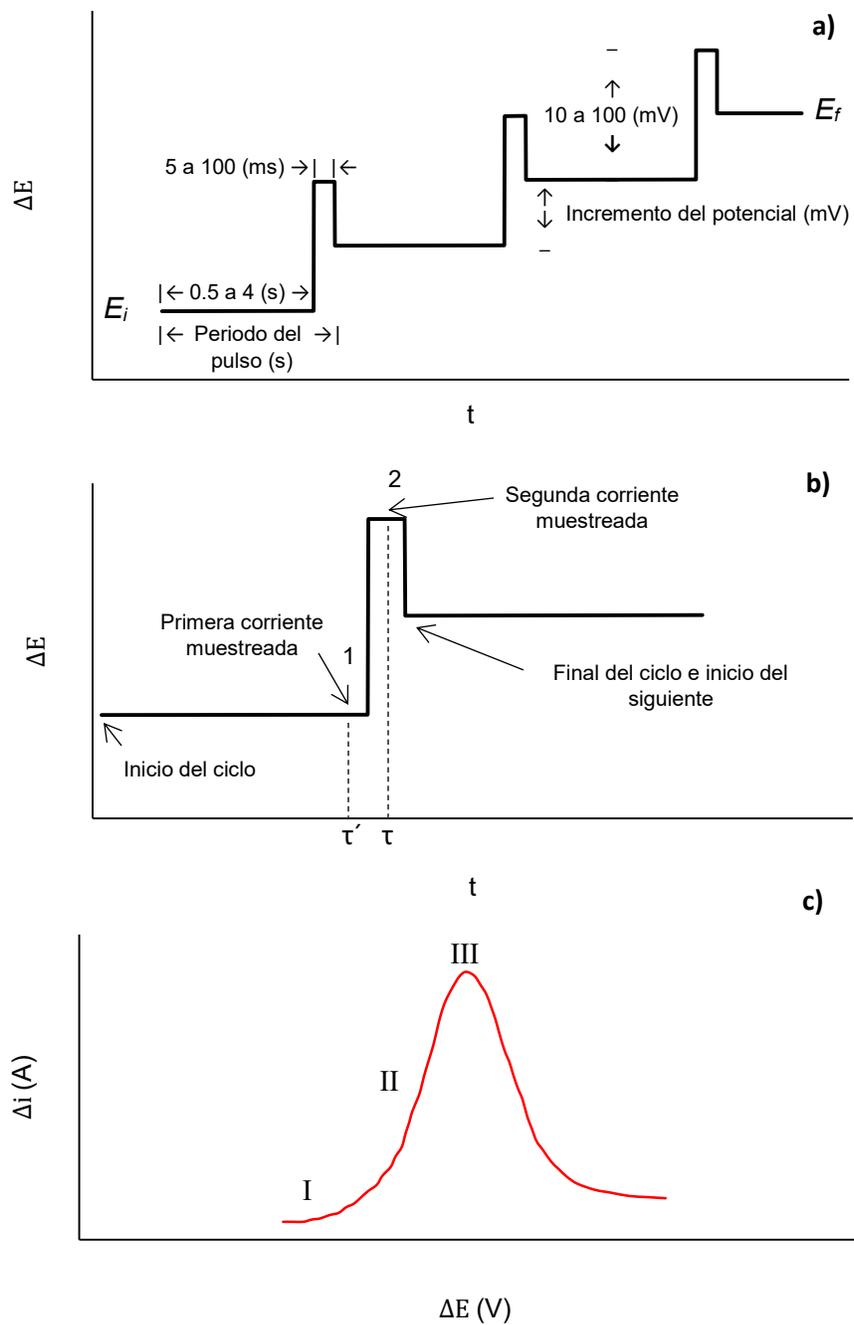


Figura 2.5. a) Programa de perturbación, b) muestra de corriente y c) registro para la técnica de voltamperometría diferencial de pulsos.

El pico en voltamperometría diferencial de pulsos para un sistema reversible ocurre a un potencial:

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (2.24)$$

Donde ΔE es la amplitud del pulso (con signo incluido). La razón de la diferencia entre E_p y $E_{1/2}$ para una cinética rápida es que la corriente se traza como una función del potencial base y no como una función del potencial a la mitad del pulso.

La corriente de pico, i_p , esta dada por la expresión:

$$i_p = -\frac{nFAD^{1/2}c^*}{(\pi t)^{1/2}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right) = i_{Cottrell} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right) \quad (2.25)$$

donde

$$\sigma = e^{\left(\frac{nF \Delta E}{RT} \frac{\Delta E}{2}\right)} \quad (2.26)$$

y $i_{Cottrell}$ es la corriente en la ecuación de Cottrell en el tiempo de muestreo t (ecuación 2.14). Se pueden considerar dos casos extremos de esta expresión.

I. Gran $|\Delta E|$, $\sigma \gg 1$. El término $\left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right)$ se convierte en ± 1 (reducción u oxidación, respectivamente), igual al valor para la voltamperometría normal de pulsos, y la $i_p = i_{Cottrell}^{[77]}$.

II. Pequeño $|\Delta E|$. Por expansión de $\left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right)$, se encuentra que $\sigma \rightarrow \left(\frac{nF\Delta E}{4RT}\right)$.

$$i_p = -\frac{n^2 F^2 A D^{1/2} c^*}{4RT(\pi t)^{1/2}} \Delta E = i_{Cottrell} \left(\frac{nF\Delta E}{4RT}\right) \quad (2.27)$$

Esta última ecuación es válida si el ΔE es menor que $\left(\frac{2RT}{nF}\right)$. La expresión para el ancho medio a la mitad de la altura,

$$W_{1/2} = \frac{3.52RT}{nF} \quad (2.28)$$

arroja un valor de $90.4/n$ mV a 25 °C, que muestra que los picos separados por $50/n$ mV pueden resolverse. A medida que el sistema se vuelve más irreversible, la

diferencia entre $E_{1/2}$ para un sistema reversible y E_p aumenta, el pico se hace más ancho y su altura disminuye. Los valores de ΔE superiores a 100 mV no son útiles porque el ancho del pico aumenta con la amplitud del pulso.

Se han descrito muchas aplicaciones de la voltamperometría diferencial de pulsos. Un ejemplo interesante es la oxidación de las bases del ADN de hebra sencilla, en el que un escaneo de oxidación seguido de un escaneo de pulso diferencial de reducción muestra claramente la adsorción y el bloqueo de la superficie del electrodo; la escala de tiempo relativamente lenta del escaneo diferencial de pulsos es apropiada para este propósito. El efecto de la adsorción de reactivos sobre la forma del pico y el potencial máximo se ha estudiado a fondo^[78, 79]. La descripción de los sistemas mediante esta técnica electroquímica no es sencilla pero, la relación entre la corriente y la concentración se mantiene, por lo que es muy útil para determinar cuantitativamente especies electroactivas en disolución.

2.1.4 Impedancia electroquímica

La impedancia electroquímica, es una técnica electroquímica bien establecida como una herramienta poderosa para investigar los mecanismos de las reacciones electroquímicas, para medir las propiedades dieléctricas y de transporte de los materiales, para explorar las propiedades de los electrodos porosos y para investigar las superficies pasivas. El poder de la técnica surge de: (I) es una técnica lineal y por lo tanto los resultados son fácilmente interpretados en términos de teoría de sistemas lineales, (II) si se mide sobre una gama de frecuencia infinita, la impedancia contiene toda la información que puede obtenerse del sistema mediante técnicas de perturbación/respuesta eléctricas lineales, (III) la eficiencia experimental (cantidad de información transferida al observador en comparación con la cantidad producida por el experimento) es extraordinariamente alta y (IV) la validez de los datos se determina fácilmente usando técnicas de transformación integral (las transformaciones de Kramers-Kronig) que son independientes de los procesos físicos implicados^[80].

En esta técnica se aplica una perturbación sinusoidal de diferencia de potencial eléctrico con una amplitud y frecuencia variable, y registrar los valores de corriente asociados a esta perturbación. También se puede aplicar una corriente sinusoidal y registrar como consecuencia la diferencia de potencial asociada. En la figura 2.6 se puede observar el programa de perturbación para esta técnica, en el caso que se aplique una diferencia de potencial.

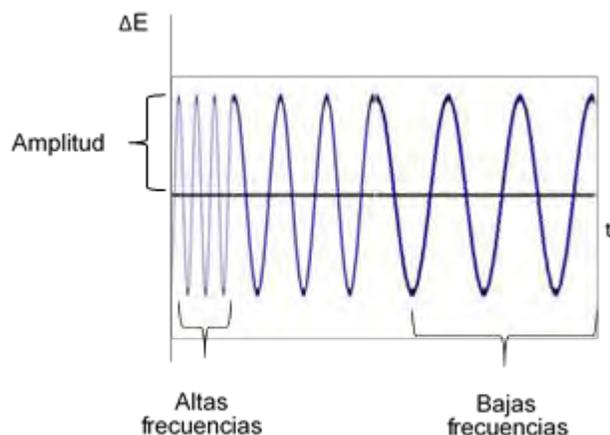


Figura 2.6. Programa de perturbación para técnica de impedancia electroquímica, cuando se aplica una diferencia de potencial.

La impedancia se define como el cociente entre el potencial y la intensidad de corriente de salida, para corriente alterna se tiene que

$$Z = E/i \quad (2.29)$$

donde Z representa la impedancia del circuito en unidades de Ohm (Ω), la cual dependerá de la frecuencia de la señal aplicada. La amplitud de la señal, la amplitud de la señal de potencial alterno y el ángulo de fase son los parámetros que definen la impedancia de un sistema. La impedancia es una propiedad que se aloja en el campo de los números complejos y su representación puede ser cartesiana o polar. De la parte real (Z_r) se puede obtener la conductancia y de la parte imaginaria (Z_i) la capacitancia^[80, 81].

Una manera, aunque no la única, de representar los resultados de un experimento de impedancia son los llamados diagramas de Nyquist. Este diagrama nos muestra

la parte imaginaria multiplicada por -1 como función de la parte real. En la figura 2.7 se muestra un diagrama de este estilo donde R_{disol} y R_{tc} representan la resistencia de la disolución en la celda electroquímica y la resistencia a la transferencia de carga.

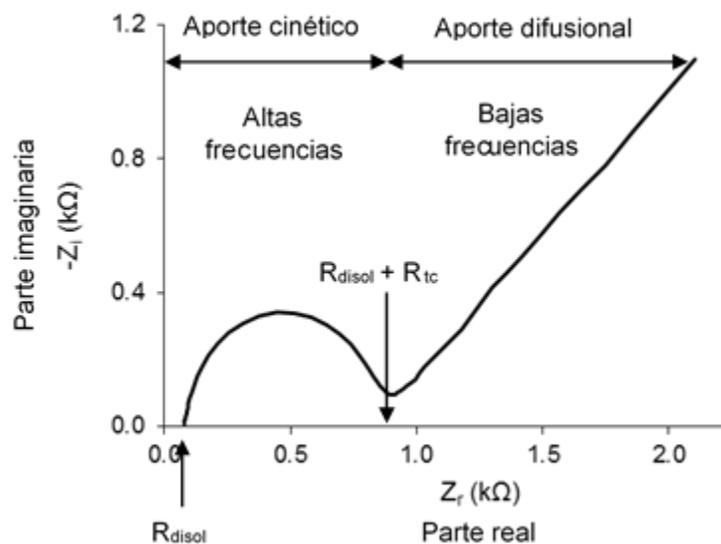


Figura 2.7. Diagrama de Nyquist.

2.2 Calorimetría

2.2.1. Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica experimental que permite determinar cuantitativamente y de manera directa el calor liberado o absorbido durante un proceso o reacción química, que a presión constante es el cambio de entalpía (ΔH) del sistema. Ya que en cualquier proceso químico existe un cambio en energía, esta técnica permite el estudio de diversos sistemas y como consecuencia su aplicación en distintas áreas de investigación como: la química, física, farmacia, bioquímica, biofísica y biofísicoquímica, así como en las industrias alimentarias y de cosméticos^[82].

En cuanto a las áreas químicas y biológicas esta técnica es aplicable al estudio de interacciones intermoleculares e intramoleculares de biomoléculas^[83] en el estudio de las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-

ARN y en moléculas de menor peso molecular para el estudio de la formación de especies auto asociables en disolución como micelas^[84] o liposomas^[84]. Es la única técnica que puede determinar simultáneamente todos los parámetros de una unión en un solo experimento, sin necesidad de modificar los componentes que forman esta unión, ya sea con marcadores fluorescentes o por medio de inmovilización. Midiendo la afinidad de los componentes de la unión en sus estados nativos.

En la figura 2.8 se muestra la interacción simplificada entre un ligando y una molécula receptora. En términos biológicos el ligando puede ser un inhibidor, fármaco, sustrato, coenzima, cofactor, grupo prostético, polipéptido, proteína, ácido nucleico, ion metálico o compuesto de coordinación que interactúe de manera no covalente en un sitio específico o inespecífico de la primera molécula, la cual suele ser una proteína o ácido nucleico.

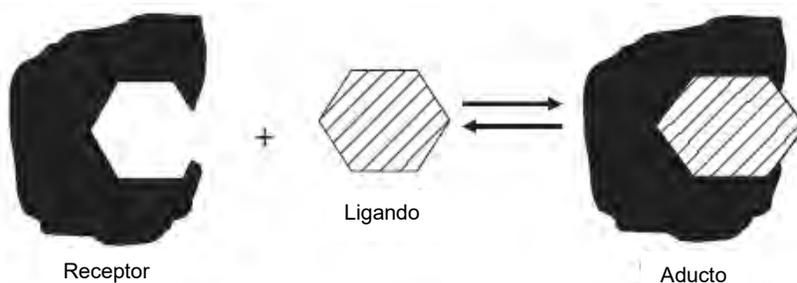


Figura 2.8. Un modelo simplificado de una típica interacción receptor-ligando-aducto. El ligando en esta representación se muestra que coincide geoméricamente con el sitio de unión en el receptor para indicar una unión de interacción específica, aunque esto no siempre es así. Adaptada^[86].

Estos modelos se representan con tres especies en equilibrio, el biopolímero, el ligando en forma libre y el aducto. Si el efecto térmico neto de la interacción es suficientemente grande se puede determinar en un único experimento, realizado en óptimas condiciones, la estequiometría (n), el cambio en la entalpía de formación (ΔH) y la constante de formación o disociación (K) del proceso de estas uniones moleculares. Consecuentemente, se puede calcular el cambio en la energía libre estándar de Gibbs (ΔG°), el cambio en la energía libre efectiva de Gibbs (ΔG) y por último la entropía del proceso de unión (ΔS). Entendiendo el sistema desde el punto de vista de una constante de equilibrio para el proceso de unión como se describe a continuación^[86, 87].

$$K_{eq} = \frac{[Aducto]_{eq}}{[Receptor]_{eq}[Ligando]_{eq}} \quad (2.30)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (2.31)$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[Aducto]}{[Receptor][Ligando]} \right) \quad (2.32)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (2.33)$$

En este tipo de interacciones el calor está asociado a un cambio de estado después cada inyección y es proporcional al incremento de la concentración del complejo en la celda del calorímetro después de la inyección i ^[88].

$$Q_i = V \Delta H \left([Aducto]_i - [Aducto]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V} \right) \right) \quad (2.34)$$

Donde ΔH es el cambio en la entalpía de unión, V el volumen en la celda del calorímetro y v es el volumen de inyección. Las inyecciones continúan hasta que no se detecta calor significativo. Esto quiere decir que la concentración de la nueva especie alcanza su máximo valor. A lo largo del experimento las concentraciones de las especies libres son variables independientes y conocidas.

Cabe mencionar que el ejemplo mostrado en esta sección es para interacciones de tipo heterodiméricas pero, se pueden caracterizar de manera directa interacciones homodiméricas, homocomplejas, heterocomplejas y con estequiometrias distintas de 1:1. Además, de los parámetros cinéticos de una enzima (K_{cat} y K_m)^[86, 88].

2.2.1.1 Funcionamiento e instrumentación

La figura 2.9 muestra un esquema de un calorímetro de titulación isotérmica que funciona por compensación de potencia ($J s^{-1}$), midiendo en realidad la corriente puesto que el potencial se mantiene constante. La señal que se obtiene es directamente proporcional a la potencia requerida para mantener una diferencia de temperatura entre la celda de referencia y la celda de reacción igual a cero^[89]. Estas dos celdas se encuentran dentro de una cámara adiabática en la unidad del calorímetro. La celda de referencia únicamente contiene agua. Mientras que en la celda de reacción estará contenido el medio de reacción y mediante una jeringa

especializada, la cual además funciona como agitador para mantener homogéneo el sistema durante la titulación, se hacen adiciones de un volumen controlado (mínimo de 1 a 2 μL) a la celda de reacción. Esta jeringa puede tener un volumen de entre 60 y 300 μL dependiendo el modelo del calorímetro. Existen calorímetros donde tanto en la celda de referencia como en la de reacción se realizan adiciones de volúmenes iguales mientras se mantiene homogéneo el sistema, esto con el fin de corregir el calor por efecto de la dilución. Cuando se tiene un calorímetro de inyección simple se deben realizar dos experimentos separados. El primero donde se mida el calor de dilución y un segundo donde se estudie el efecto de la reacción de interés, por lo que el efecto del calor de dilución debe ser restado del experimento donde se estudia la reacción como tal. La desventaja de esta metodología es que se introduce un error adicional a las mediciones^[87]. Las adiciones del analito (en disolución) se hacen escalonadas como función del tiempo. Este tiempo dependerá de la cinética de la reacción o proceso, el cual debe ser seleccionado por el analista mediante experimentos exploratorios.

El sistema calorimétrico mantiene la celda de referencia a una temperatura constante, seleccionada por el analista de entre 10 y 60 $^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, mientras se aplica una potencia constante a la celda de reacción para activar un mecanismo de control por retroalimentación cuyo propósito es mantener la $\Delta T = 0$ entre las dos celdas. Dado que la reacción se lleva a cabo en la celda denominada de reacción, el sistema aplica a ésta una potencia o se deja de aplicar dependiendo de si el proceso es endotérmico o exotérmico, respectivamente. La diferencia de temperatura detectable por los calorímetros está entre 10^{-4} y 10^{-5} $^{\circ}\text{C}$ y depende de la chaqueta adiabática, el material de las celdas y la igualdad que exista entre ellas.

Los compartimentos de la celda están contruidos de tal forma que solamente permitan el flujo de calor entre la las celdas de titulación y el dissipador de calor a través de los detectores térmicos conocidos como termopilas. Estas termopilas son dispositivos electrónicos que transforman la energía térmica en eléctrica, este potencial eléctrico es directamente proporcional a la diferencia de temperatura en las caras de las termopilas. A su vez esta diferencia en temperatura es proporcional

a la energía térmica (velocidad de transferencia de calor en J s^{-1}) que se está intercambiando entre las celdas de titulación y el dissipador de calor^[87].

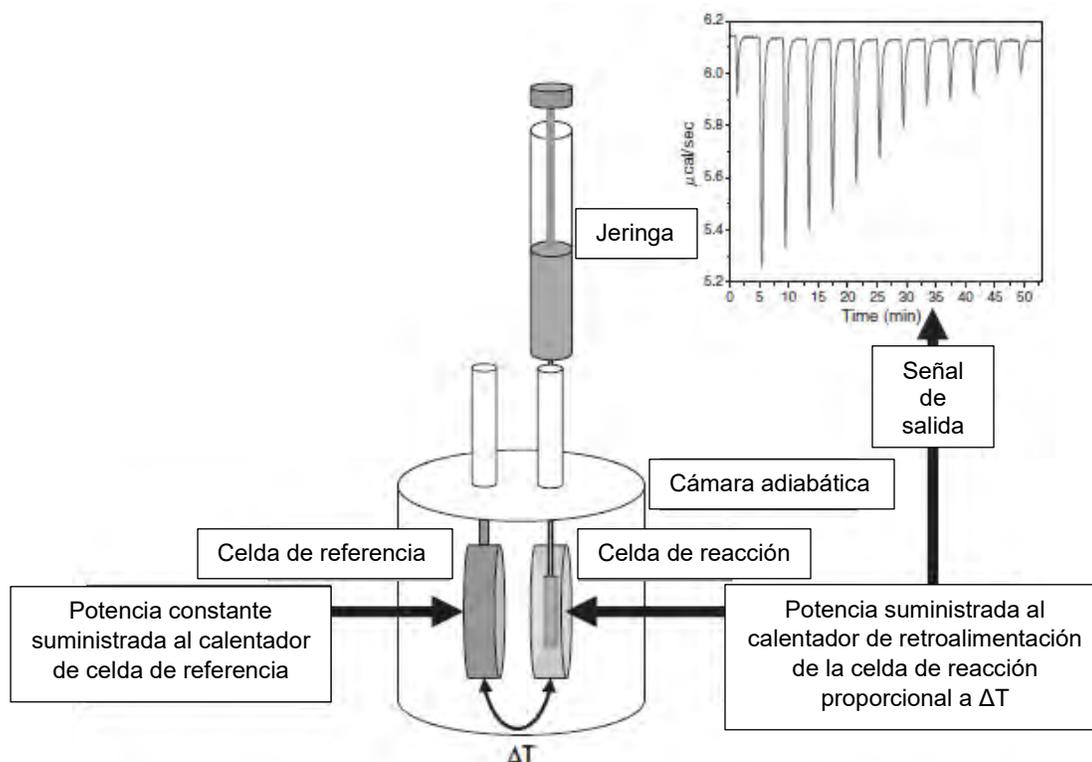


Figura 2.9. Esquema de las celdas y procesador de datos de un calorímetro de titulación isotérmica (adaptada)^[86].

El cambio en energía térmica traducido como la diferencia de potencial por las termopilas es medido por un potenciómetro de alta sensibilidad y finalmente registrado por una computadora observando una señal característica con forma de pico, donde si este pico es delgado se puede hablar de una cinética de reacción rápida y si es ancho de una cinética lenta. El área bajo este pico corresponde al calor liberado o absorbido durante el proceso después de cada inyección. Hoy en día los calorímetros de titulación isotérmica son simples de usar, compactos y son controlados desde una computadora, tienen una alta sensibilidad y es posible obtener la caracterización termodinámica de un sistema en un corto tiempo^[88].

2.2.1.2 Condiciones óptimas

Un experimento de calorimetría de titulación isotérmica debe realizarse bajo condiciones en las que el cambio de calor pueda ser medible (si no hay suficiente calor producido por la reacción, entonces el experimento será imposible) para cada inyección y donde el cambio de calor varíe para las inyecciones subsiguientes. Produciendo una gráfica del cambio de calor frente al número de inyección o proporción molar de ligando/macromolécula, llamado termograma.

Los termogramas presentan un perfil curvo, el que depende fuertemente de la concentración de la molécula receptora y de la constante de equilibrio (K). Y de esta curvatura dependerá si es o no posible realizar un análisis de regresión no lineal para obtener un valor de K preciso. Ahora bien, en reacciones donde la constante de equilibrio es muy grande ($K > 10^8 \text{ mol L}^{-1}$) la concentración de la macromolécula receptora debe ser relativamente pequeña y suficientemente alta para arrojar un valor de calor registrable^[86, 88]. Es por eso que en la planificación es de vital importancia la selección de las concentraciones de las disoluciones de la molécula receptor y el ligando, que estas sean preparadas con excelente precisión y además deben estar iguales en pH y fuerza iónica para evitar señales de calor relacionadas con el mezclado o dilución que enmascaren las señales del proceso de unión.

El calor de dilución para el ligando y la macromolécula debe determinarse en experimentos separados conocidos como blanco. En el caso del ligando este se titula en el medio de reacción y para la macromolécula se hacen inyecciones de medio de reacción desde la jeringa. Siendo completamente rigurosos se debe de hacer un tercer blanco de medio de reacción titulado con medio de reacción. Todos estos experimentos deben realizarse en las mismas condiciones de inyección que al momento de coleccionar la información, las cuales suelen estar alrededor de 1.5 mL en la celda de reacción y 10 μL por inyección y la concentración del reactivo en la celda debe ser del orden de $10 - 20 \times n$ veces la concentración de la macromolécula, donde n es el número de sitios de unión por molécula^[88].

La ecuación para el calor corregido se puede escribir como^[86]:

$$Q_{\text{corregido}} = Q_{\text{medido}} - Q_{\text{dilución ligando}} - Q_{\text{dilución macromolécula}} - Q_{\text{medio}} \quad (2.35)$$

Si en el proceso de unión existe un proceso de intercambio de iones hidronio se deben hacer correcciones y consideraciones extra. Otra consideración sobre el calor medido es la formación o introducción de burbujas en alguna de las dos celdas, ya que estas arrojaran señales de calor falsas. Por lo que las disoluciones deben ser degasificadas antes de llenar la celda y la jeringa de inyección.

2.2.1.3 Análisis de los datos

El análisis de los datos obtenidos de un experimento de calorimetría de titulación isotérmica es un proceso iterativo. Donde se hace un estimado de los parámetros en el modelo de la ecuación, con estos valores se construye una curva teórica con la cual es comparada con los datos experimentales a través de una prueba estadística de χ^2 (chi cuadrada) y con el algoritmo adecuado se ajustan los parámetros una y otra vez hasta que la función estadística se minimiza, es decir la curva teórica describe mejor los valores experimentales. Si no existe una buena minimización en acuerdo con el valor del error experimental esperado, entonces se tiene que probar otro modelo^[86]. Es muy importante recordar que en el uso de algoritmos iterativos un buen resultado dependerá de la estimación de los parámetros en el paso inicial.

Los calorímetros incluyen softwares de procesamiento de datos con los modelos de análisis de regresión no lineal para polinomios de alto grado. Estos facilitan el trabajo y permiten comparar varios modelos, para discernir mejor entre los resultados de uno y otro.

2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido es la técnica más directa para la obtención de las propiedades energéticas de macromoléculas biológicas dando acceso al mecanismo termodinámico que gobierna un equilibrio termodinámico es decir, la obtención de la energía asociada al pasar de un estado nativo a uno desplegado, en el contexto de las proteínas, a través de la determinación de la capacidad calorífica como función de la temperatura.

2.2.2.1 Instrumentación y experimentos

El equipo para la realización de un experimento de calorimetría diferencial de barrido es prácticamente igual al equipo de titulación isotérmica mostrado en la figura 2.9. Las grandes diferencias radican en que no existe una jeringa de adición/agitado y el experimento se realiza a concentración constante variando temperatura. En las dos celdas (en principio idénticas) se colocan la disolución problema, proteína, en la celda de reacción y un volumen igual del disolvente (generalmente un amortiguador) en la celda de referencia, los volúmenes en las celdas de los calorímetros pueden ir desde 0.3 – 1.5 mL. Estas celdas son calentadas simultáneamente a una velocidad constante que puede ir desde 10 a 250 °C h⁻¹ en un rango de temperaturas desde los 5 a 120 °C. Las celdas se encuentran en una cámara adiabática presurizadas con aire o nitrógeno para poder exceder el punto de ebullición del agua.

El calorímetro monitorea la energía necesaria para aumentar la temperatura midiendo la potencia eléctrica para mantener entre las celdas una diferencia de temperatura prácticamente cero. Esta potencia eléctrica es directamente proporcional a la capacidad calorífica aparente, $\Delta C_{p,ap}$, entre las dos disoluciones contenidas en las celdas la cual es fundamental para obtener todos los C_p de las disoluciones mediante la ecuación 2.36^[90 – 92].

$$\Delta C_{p,ap} = C_{p, disolvente} \times m_{disolvente} - C_{p,proteína} \times m_{proteína} \quad (2.36)$$

Donde $m_{disolvente}$ y $m_{proteína}$ son la masa remplazada del disolvente y de la proteína, respectivamente. Introduciendo el volumen específico $v = V/m$ y resolviendo para la capacidad calorífica de la proteína se obtiene la ecuación 2.37^[92].

$$C_{p,proteína} = C_{p,disolvente} \times \frac{v_{proteína}}{v_{disolvente}} - \frac{\Delta C_{p,aparente}}{m_{proteína}} \quad (2.37)$$

Para realizar un experimento de calorimetría diferencial de barrido exitoso se debe de ser cuidadoso en la preparación de las disoluciones. En general, el disolvente debe ser filtrado y liberado de gases. La disolución de la muestra debe estar libre

de oxígeno, especialmente si hay cisteínas libres en la proteína. La disolución de la proteína debe ser dializada varias veces con el medio amortiguado antes de la medición. Las concentraciones típicas de proteína que pueden medirse con precisión mediante la instrumentación actual están en el intervalo de 0.1 mg mL^{-1} a 10 mg mL^{-1} . Las altas concentraciones producen una relación señal/ruido favorable, pero pueden favorecer la agregación irreversible irreconciliable de las muestras, misma que a menudo es revelada por una leve turbidez cuando la disolución se elimina de la celda después del experimento.

2.2.2.2 Registros e información contenida en los experimentos

El termograma o traza calorimétrica, como se conocen a los registros obtenidos de un experimento de calorimetría diferencial de barrido, en el caso más sencillo de una proteína pequeña y globular con un proceso simple del paso del estado nativo al desplegado, reversible y sin dependencia de la velocidad de barrido se compone de tres partes, mismas que se muestran en la figura 2.10. Existen dos regiones que muestran una dependencia de C_p con temperatura aproximadamente lineal, ambas separadas por un pico. Este pico refleja una transición de primer orden entre los dos estados comunes de las proteínas, el llamado estado nativo y el estado desnaturalizado. El estado nativo es el estado biológicamente funcional en el que se encuentra a la proteína en condiciones fisiológicas. También se caracteriza por tener una estructura tridimensional bien definida. En contraste, el estado desnaturalizado no tiene una estructura única definida y carece de función biológica. La región de transición está marcada por un pico de absorción de calor, por lo que este proceso es endotérmico para las proteínas estudiadas hasta hoy. Se ha asumido tradicionalmente que el área bajo la curva de este pico es proporcional a la fracción de moléculas desnaturalizadas. Esta área, después de haber restado las correspondientes líneas base, es el ΔH calorimétrico de la transición del estado nativo al desplegado de la proteína. La temperatura del punto medio de la transición se llama T_m y se ha definido como la temperatura a la que se ha desnaturalizado el 50% de las moléculas y el C_p ha tomado el máximo valor. El ancho a la mitad del área total del pico se conoce como $T_{1/2}$ y es un parámetro que está ligado con la

cooperatividad del proceso de desplegamiento inducido por temperatura, una alta cooperatividad del proceso arrojará un pico agudo mientras que con una baja cooperatividad se observará un pico más ancho^[90 - 92].

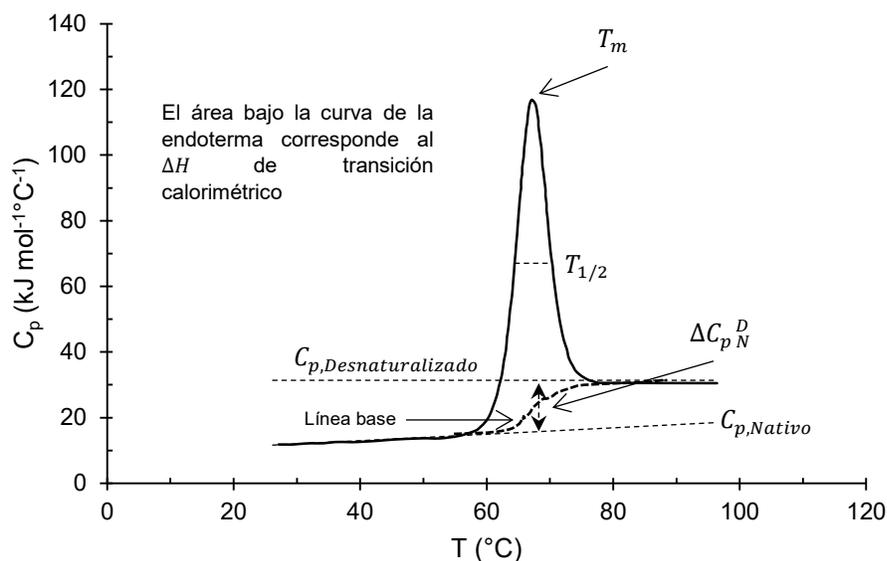


Figura 2.10. Traza calorimétrica obtenida de un experimento de calorimetría diferencial de barrido, donde se muestra una parte de la información termodinámica que se puede obtener.

El análisis de las trazas calorimétricas es muy diverso, el más sencillo es el ya mencionado obteniendo al área bajo la curva calorimétrica. Pero en ocasiones se necesita de más información o el proceso observado es mucho más complicado por lo que se requieren de análisis de datos más minuciosos con termodinámica estadística, ajustes a las trazas de capacidad calorífica, deconvolución de las endoterma, tratamientos para procesos irreversibles o gobernados por cinética y para el estudio de reacciones asociadas^[90, 92]. Tratamientos que no se abordarán a profundidad en este trabajo.

2.3 Espectrofotometría ultravioleta y visible

La espectrofotometría ultravioleta y visible se basa en la interacción de la radiación electromagnética, en una región característica, que puede absorber o transmitir una muestra de materia de interés químico. Todas las técnicas de absorción suponen que cuando un tipo radiación incide sobre la muestra se produce una absorción

parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transición electrónica entre los niveles energéticos de la sustancia (átomo, molécula o ion) X, pasando esta al estado excitado, X*, el resto de radiación es transmitida. Así analizando una u otra podemos relacionar la cantidad de especie activa presente en la muestra^[93].

La región para el ultravioleta se extiende desde 1 hasta 400 nm, ésta a su vez está subdividida en el ultravioleta cercano de 200 a 400 nm y el lejano o ultravioleta al vacío que va de 1 a 200 nm. Mientras que la región del visible va desde 400 hasta 800 nm^[94].

2.3.1 Relaciones fundamentales

La longitud de onda, λ , es la distancia entre dos valles o dos crestas de dos ondas continuas.

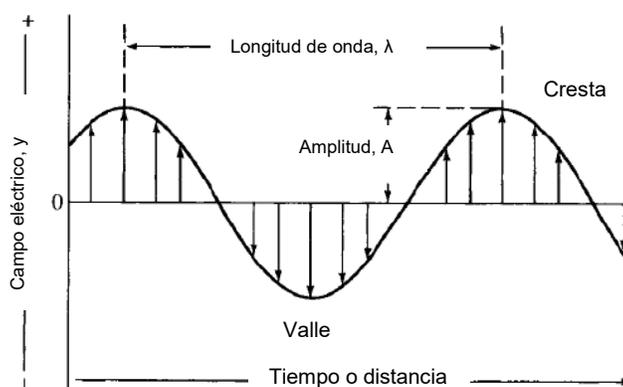


Figura 2.11. Representación bidimensional de un vector eléctrico (adaptada)^[66].

La frecuencia, ν , es el número de oscilaciones de una onda por unidad de tiempo^[95]. Como se muestra en la siguiente expresión:

$$\nu\lambda = c \quad (2.38)$$

donde:

ν : frecuencia.

λ : longitud de onda.

c : velocidad de la luz en el vacío ($2.998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$).

Para un medio distinto al vacío se corrige c/n , donde n es el índice de refracción de la luz en ese medio.

Debido a la naturaleza dual de la radiación electromagnética permite concebirla como partículas, fotones. Entonces el transporte de energía de un fotón está dado por la siguiente ecuación^[95]:

$$E = h\nu \quad (2.39)$$

donde:

ν : número de onda.

h : constante de Planck (6.6262×10^{-34} J s).

E : energía asociada a la radiación (J).

Si se combinan las ecuaciones 2.38 y 2.39 se tiene la ecuación 2.40.

$$E = h \frac{c}{\lambda} = hc\nu \quad (2.40)$$

2.3.2 Instrumentación

La instrumentación para el estudio de muestras de interés químico mediante el uso de la espectrofotometría ultravioleta y visible tiene algunos componentes principales los cuales se describen a continuación, para un espectrofotómetro de doble haz^[93, 94].

- Fuente de radiación: su función es generar radiación policromática intensa en toda la región de interés. Se utilizan dos fuentes de radiación para cubrir toda la región. Para la zona ultravioleta cercana (200 – 350 nm) se utiliza un tubo de descarga de hidrógeno o deuterio. Mientras que para la región entre 350 y 1100 nm se utiliza una lámpara incandescente de tungsteno.
- Monocromador: se utiliza para seleccionar de la radiación incidente un haz monocromático. Como elementos dispersivos pueden utilizarse prismas o redes de difracción.

- **Fotómetro:** la radiación monocromática que entra es descompuesta en dos haces de igual intensidad mediante el separador de haces y pasan hacia las muestras.
- **Porta muestras:** los dos haces concentrados por unos lentes atraviesan las celdas que contienen las muestras, la referencia o blanco y la muestra, pasando hacia el detector como dos haces monocromáticos de diferente intensidad.
- **Detector:** los dos haces monocromáticos de diferente intensidad llegan al detector, cuya función es convertir estos estímulos luminosos en una señal de tipo eléctrico.
- **Amplificador:** compensa electrónicamente la absorción del disolvente, medio o blanco y de la disolución con la muestra de manera electrónica.
- **Registrador:** registra automáticamente el espectro como una curva de longitud de onda de las radiaciones absorbidas como función de la absorbancia, A , o absorptividad molar, ϵ .

La figura 2.12 muestra de manera muy simplificada un esquema de la instrumentación de espectrofotómetro de doble haz.

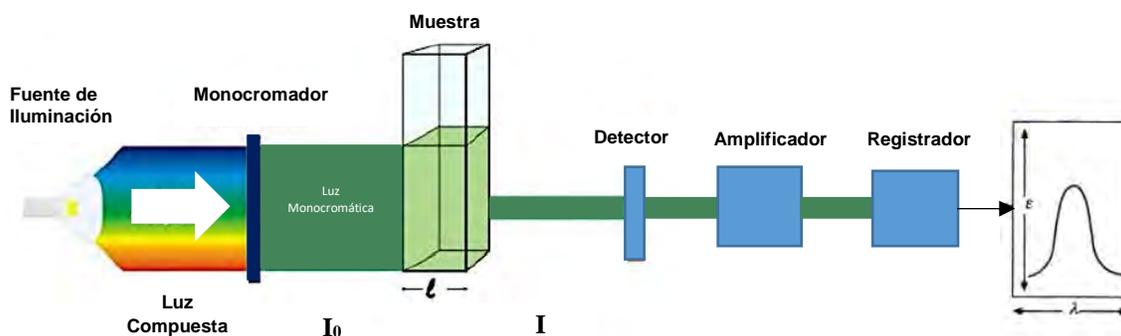


Figura 2.12. Representación esquemática de un espectrofotómetro.

2.3.3 Condiciones de operación

La obtención experimental de un espectro de absorción es relativamente sencillo ya que los espectrofotómetros están altamente automatizados y permiten la digitalización de la información. Lo realmente interesante es la selección de los

disolventes, medios de reacción, celdas, y longitudes de onda, según lo que se desee estudiar. A continuación se describen algunos ejemplos sobre la selección de la instrumentación óptica^[93].

Para el trabajo en la región del ultravioleta lejano, 1 a 200 nm

- Es imprescindible el uso de equipos al vacío toda vez que el aire absorbe en esta zona.
- Los materiales de los que están contruidos normalmente los componentes ópticos, celdas, lentes y elementos dispersivos, vidrio o cuarzo también absorben fuertemente en la zona del ultravioleta lejano. Por lo que se requieren materiales más especializados como LiF, CaF₂ o zafiros.
- Muchos disolventes también absorben en esta zona por lo que se recomienda el uso de hidrocarburos saturados o perflourados.
- Se debe tener especial cuidado porque los detectores no son muy sensibles a esta zona y tampoco existe mucha selectividad, muchos compuestos presentan absorción en esta zona.

Si se desea utilizar la zona del ultravioleta cercano, 200 a 400 nm.

- Presenta mucho menos inconvenientes que la región del lejano puesto que se pueden utilizar celdas de cuarzo solo si se quiere acceder a regiones inferiores a los 350 nm pero si no, es suficiente con una celda de vidrio.

Por último, la región del visible, 400 a 800 nm es la zona más simple instrumentalmente para trabajar, toda vez que es la región capaz de impresionar la vista del ojo humano y las transiciones electrónicas son de muy baja energía. Todos los compuestos coloreados absorben de manera selectiva en esta región.

- Por lo tanto con una celda de vidrio es más que suficiente, pero en su defecto se puede usar una celda de plástico solo con precaución de que el disolvente del medio de reacción no sea abrasivo al plástico.

2.3.4 Aplicaciones de la espectrofotometría ultravioleta y visible y ley de Lambert Beer Bouguer

La espectrofotometría de ultravioleta y visible tiene aplicación en diversas ramas e intereses de la química como:

- La elucidación de estructuras de compuestos orgánicos e inorgánicos.
- Determinación de constantes fisicoquímicas.
 - Equilibrios de disociación ácido-base.
 - Equilibrios tautoméricos.
- Estudios de efectos estéricos.
- Cinéticas de reacción.
- Análisis químico cuantitativo.
- Estudio de la formación de agregados en disolución.
- Interacción entre moléculas.

El uso de la espectrofotometría de ultravioleta y visible en los análisis químicos cuantitativos y en diversas caracterizaciones fisicoquímicas es bien difundido no solo en los laboratorios de investigación sino también a nivel industrial y en laboratorios de análisis clínicos debido a su sensibilidad, rapidez, precisión, selectividad y relativos bajos costos de los espectrofotómetros. Estos métodos de caracterización y/o cuantificación se basan en el uso de la ley de Lambert Beer Bouguer, la cual dice que si se hace incidir una luz monocromática de intensidad incidente I_0 a través de una disolución que contiene un íesimo analito de concentración $[i]$ a través de una longitud de paso óptico l , la intensidad de la luz en cualquier punto del paso óptico de la disolución es función de $[i]$ y de l , y dicha función tiene una forma diferencial total^[96].

$$dI = \left(\frac{\partial I}{\partial l}\right)_{[i]} dl + \left(\frac{\partial I}{\partial [i]}\right)_l d[i] \quad (2.41)$$

La cual después de un tratamiento matemático conduce a la escritura de la expresión de la ley de Lambert Beer Bouguer más conocida^[96].

$$-\log T = A = \varepsilon_i l [i] \quad (2.42)$$

donde:

T : transmitancia.

A : absorbancia.

ε_i : coeficiente de absortividad molar de la especie i a una longitud de onda λ , [L mol⁻¹cm⁻¹].

l : longitud del paso óptico.

$[i]$: concentración molar efectiva de la especie i que absorbe a la longitud de onda λ .

Para que la aplicación de esta ley conserve la linealidad entre la absorbancia y la concentración deben satisfacerse determinadas condiciones:

- Es una ley límite que aplica solo para disoluciones diluidas.
- Debe utilizarse luz monocromática. Esta condición puede considerarse satisfecha cuando la anchura espectral de radiación que abandona el monocromador sea sensiblemente menor que la anchura media de las bandas de absorción a utilizar.
- Los errores en la determinación de absorbancia son aceptables en el intervalo 0.2 - 1.0 unidades de absorbancia siendo recomendable trabajar en el rango 0.3 - 0.8. En los equipos más modernos la precisión espectrofotométrica que se alcanza permite extender estos límites.

Esta técnica, como todas, tiene sus ventajas y desventajas. La principal ventaja es que, se puede usar poco volumen de disolución y la principal desventaja es que en ocasiones se tiene que añadir un cromóforo a la disolución, el cual evidentemente modifica el ambiente en disolución y como consecuencia sus propiedades. Este

cromóforo se debe añadir en una baja e igual concentración para cada experiencia. La técnica puede utilizarse para el análisis de mezclas siempre y cuando las sustancias posean espectros apreciablemente diferenciables y se cumpla de ley de aditividad.

Capítulo 3
Experimental

3.1 Materiales, disoluciones e instrumentos

La Casiopeína III-ia fue sintetizada por investigadores del laboratorio 210 del departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química siguiendo el procedimiento descrito en la literatura y se obtuvo con una pureza superior al 99 %^[6, 7], con una masa molar de 444.92 g mol⁻¹. Para la preparación de todas las disoluciones acuosas se utilizó agua tipo 1 con una resistividad mayor a 18 MΩ cm⁻¹ a 25 °C y con un contenido de carbono orgánico menor a los 5 µg L⁻¹. Los compuestos usados para preparar la disolución amortiguadora estudiada en este trabajo fueron tris(hidroximetil)aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂) con una masa molar de 121.14 g mol⁻¹ con una pureza ≥ 99 % de la marca Sigma Aldrich, KCl con una masa molar de 74.55 g mol⁻¹ y una pureza igual a 99.9% de la marca J.T. Baker y HCl concentrado (36.5 - 38 % v/v) de J.T. Baker. Los ligantes de las Casiopeínas con los que se realizaron algunas pruebas fueron acetilcetona con una masa molar de 100.12 g mol⁻¹ con una pureza ≥ 99.3 % y 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina de masa molar igual a 184.24 g mol⁻¹ con una pureza del 99%, todos de la marca Sigma Aldrich. El nitrato de cobre (Cu(NO₃)₂·5/2H₂O), tiene una masa molar de 286.57 g mol⁻¹ con una pureza >99.99 % de la marca Sigma Aldrich. La proteína estudiada fue albúmina sérica humana en polvo liofilizado, libre de ácidos grasos esenciales de la marca Sigma Aldrich. Ferricianuro de potasio (K₃[FeCN₆]) con una masa molar de 329.25 g mol⁻¹ de pureza ≥ 99.0% de la marca Merck. Todos los compuestos empleados se utilizaron sin purificación adicional.

Para la determinación de todas las masas se usó una balanza analítica AT250 (Mettler-Toledo, Intl.) con una precisión de 0.1 mg para el intervalo de 1.0 a 50.0 mg y de 0.01 mg para el intervalo de 0.1 a 1.0 mg. Para la determinación del pH de todas las disoluciones se empleó un potenciómetro digital Orion Star A211 (Thermo Scientific, EUA) en modo de determinación de pH con hasta cinco puntos de calibración con disoluciones amortiguadoras. Con un intervalo desde -2.00 a 20.00 con resolución de 0.01 y una precisión en la determinación del pH = ± 0.002. Para la toma de alícuotas se utilizaron micropipetas (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)

de diferente capacidad: de 0.1 A 2.5 μL , de 0.5 a 10 μL , de 20 a 200 μL y de 100 a 1000 μL . Todas con una incertidumbre de $\pm 3\%$.

La disolución amortiguadora de Tris-HCl a $\text{pH} = 7.40 \pm 0.01$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$, fue preparada pesando la cantidad adecuada de la sal de Tris y disuelta en el agua desionizada tipo 1 cuanta baste para obtener una concentración de 0.1 mol L^{-1} más KCl tal que la concentración de esta sal fuera de 0.1 mol L^{-1} . Ajustando el valor de pH con HCl concentrado (36.5 – 38 % v/v). Esta disolución simula un medio fisiológico.

La disolución del ligante 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, fue preparada con una mezcla de medio amortiguado/etanol 90:10. Esto debido a su baja solubilidad en medios acuosos. El alcohol empleado fue etanol absoluto con una masa molar de 46.07 g mol^{-1} y una pureza del 99.5 % de la marca Analytyka. Para las técnicas electroquímicas y espectrofotométricas donde se usó la mezcla medio amortiguado/etanol no se observó diferencia apreciable en su comportamiento comparándolo con el medio amortiguado solo, como se verá más adelante en la sección de resultados y discusión.

Las disoluciones de proteína se prepararon pesando la cantidad suficiente de ésta, utilizando un masa molar de $66,500\text{ g mol}^{-1}$, para después ser dializadas a $4\text{ }^\circ\text{C}$ dentro de una membrana con un valor de corte de masa molar de $3,500\text{ g mol}^{-1}$ de la marca Spectra/Por en un volumen de disolución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 mol L^{-1} con KCl 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ con una relación de volumen de 100:1. Reemplazando el amortiguador después de 3 horas en la primera ocasión, después de 5 horas en la segunda y después de pasada la noche anterior para la última. Este último volumen de amortiguador fue usado para preparar las disoluciones de cobre y de Casiopeína III-ia para evitar cualquier tipo de interferencia al analizar las mezclas cobre/ASH y Casiopeína/ASH en todas las técnicas experimentales.

3.2 Técnicas electroquímicas

Los experimentos electroquímicos fueron realizados a temperatura ambiente [$22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$] usando un potencióstato/galvanostato BioLogic, SP-150 (Science Instruments Claix France) controlado desde una PC con el software EC-Lab® versión 11.01. Las

mediciones fueron obtenidas en disoluciones acuosas en un medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. Las disoluciones fueron burbujeadas con nitrógeno de alta pureza (99.9995%) durante 5 minutos antes de cada experimento, para después mantener una atmósfera de este gas durante todo el experimento. La celda utilizada para todas las mediciones tiene un volumen máximo de 2.5 mL y constó de un arreglo típico de tres electrodos. Disco de carbón vítreo (CH Instruments, 3.0 mm de diámetro) como electrodo de trabajo, un alambre de platino en forma de espiral como electrodo auxiliar y un electrodo de $\text{Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$ (1.0 mol L^{-1} de KCl) como electrodo de referencia. Todas las diferencias de potencial en este trabajo están reportadas con respecto a este electrodo de referencia mismo que tiene un valor de potencial de 0.222 V con respecto a electrodo normal de hidrógeno. Antes de cada ensayo el electrodo de carbón vítreo fue pulido con alúmina alfa (CH Instruments) de 1.0, 0.3 y $0.05 \mu\text{m}$ sobre una fibra microcloth, para finalmente ser enjuagado con agua desionizada ($> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) y secado.

Todos los voltamperogramas cíclicos fueron trazados en direcciones de potenciales negativos o positivos según sea la necesidad del estudio (por triplicado) desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) con una corrección por caída óhmica del 80% de la resistencia de la disolución, la cual se determinó con un experimento previo de impedancia electroquímica. Los experimentos de impedancia fueron obtenidos alrededor del potencial de circuito abierto y en el $E_{1/2}$ para el caso del Cu(II) y la Casiopeína III-ia aplicando a la celda electroquímica una perturbación oscilante con una amplitud de 0.01 V y frecuencias entre 100 kHz y 1 Hz. A altas frecuencias los valores de las resistencias de la disolución se encontraban entre 75 y 82 Ω .

Todos los experimentos de cronoamperometría fueron realizados por triplicado. Para el caso del Cu(II) disuelto en el medio amortiguado a $\text{pH} = 7.4$ se aplicó un doble pulso en $E_1 = -0.4$ y $E_2 = 0.4$ V durante 5 segundos cada uno. Mientras que para el Cu(II) en el medio no amortiguado los pulsos de potencial fueron en $E_1 = -0.2$ V y $E_2 = 0.5$ V durante 5 segundos cada uno.

Los experimentos de voltamperometría diferencial de pulsos fueron realizados por triplicado aplicando un pulso de potencial de 7.5 mV durante 0.1 s y a una velocidad de barrido de 5.0 mV s⁻¹.

El electrodo de carbón vítreo modificado con la proteína albúmina de suero humano, empleado para estudiar el tipo de interacciones que se establecen entre la proteína y las Casiopeínas, fue preparado colocando una gota de 10 µL de la disolución de proteína 60 µmol L⁻¹ sobre la superficie del carbón vítreo y se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se enjuagó con agua tipo 1 y amortiguador 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl a pH = 7.4, para eliminar la proteína no adsorbida.

3.3 Calorimetría de titulación isotérmica

Los calores de dilución y de reacción se midieron a 25.0 ± 0.1 °C por triplicado utilizando un instrumento VP ITC (Microcal, Northampton, EUA) en el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl 0.1 a pH = 7.4. Para los experimentos con Cu(II), la disolución 2 mmol L⁻¹ de éste fue colocada en la jeringa y se tituló en la celda que sólo contiene el medio acuoso con el fin de evitar el desarrollo de un calor adicional debido al desajuste del medio acuoso y el calor de dilución correspondiente. Para los experimentos de la interacción Cu(II)-ASH la disolución 2 mmol L⁻¹ de Cu(II) fue colocada en la jeringa y se tituló en la celda con 0.086 mmol L⁻¹ de la proteína. Las titulaciones fueron de 5 µL cada 900 s. En el caso de los experimentos con la Casiopeína III-ia la disolución 0.01 mmol L⁻¹ de este compuesto fue colocada en la jeringa y se tituló en la celda que sólo contiene el medio amortiguado con el fin de evitar el desarrollo de un calor adicional debido al desajuste del medio acuoso y el calor de dilución correspondiente. Para los experimentos de la interacción Casiopeína-ASH la disolución 0.01 mmol L⁻¹ de Casiopeína III-ia fue colocada en la jeringa y se tituló en la celda con 0.001 mmol L⁻¹ de ASH. Las titulaciones fueron de 30 µL cada 900 s. Todas las disoluciones se desgasificaron en un sonicador durante 30 minutos antes de ser colocadas en el calorímetro y en la jeringa. Las señales calorimétricas se integraron para obtener los calores correspondientes con el software Origin 7.0 proporcionado por el fabricante del equipo.

3.4 Calorimetría diferencial de barrido

Todas las trazas calorimétricas de las disoluciones de proteína, proteína/Cu(II) y proteína/Casiopéina III-ia se realizaron utilizando un calorímetro VP-DSC (Microcal, Northampton, EUA) controlado mediante el software Origin 7.0 haciendo barridos de temperatura desde 20 °C y hasta 90°C a una velocidad de barrido de 60 °C h⁻¹. Determinando primero la traza calorimétrica del medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl 0.1 a pH = 7.4 contra sí mismo para después ser restada como línea base a todas las trazas calorimétricas.

3.5 Espectrofotometría ultravioleta y visible

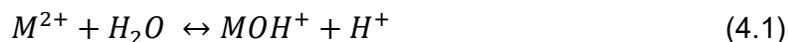
Las determinaciones espectrofotométricas de las disoluciones de la Casiopéina III-ia, ligantes de la Casiopéina, el Cu(II) y la de proteína albúmina sérica humana se realizaron por triplicado utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian, Australia) controlado desde una PC con el software CaryWin® versión 3.0. A una temperatura de [25.0 ± 0.5] °C. Utilizando una celda de cuarzo Spretosil con un paso óptico de 1 cm y capacidad máxima de 3.5 mL. Determinando primero el espectro de absorbancia del medio amortiguado de Tris-HCl 0.1 mol L⁻¹, KCl 0.1 mol L⁻¹ a pH= 7.4, para después ser restado a cada uno de los espectros de absorbancia de las disoluciones en estudio. Entre cada medición de las diferentes disoluciones la celda óptica se limpió con el agua tipo 1 y se enjuago con una pequeña cantidad de la muestra de la nueva disolución a medir.

Los espectros de absorbancia se trazaron en la región del ultravioleta y visible desde 200 a 800 nm para las todas las disoluciones para asegurarse de tener toda la información aunque los espectros reportados en la sección de resultados y discusión solo muestran las zonas de interés. Los valores de la absorbancia siempre se determinaron en el máximo de absorción que mostraron los espectros de cada disolución problema.

Capítulo 4
Resultados y discusión

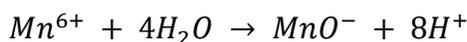
4.1 Estudio del Cu(II) y la Casiopeína III-ia en disoluciones acuosas y su interacción con la proteína albúmina sérica humana

En general cuando se trabaja con cationes metálicos se debe de considerar que éstos tienen propiedades ácido-base y se comportan como no solvoácidos es decir, generan la partícula ácida del disolvente (ecuación 4.1)^[97].



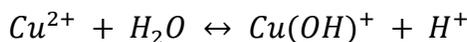
Estos pueden ser nivelados y no nivelados como se muestra en los siguientes ejemplos:

No solvoácido nivelado



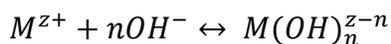
Inicio	C_0	55 mol L^{-1}		
Equilibrio	0	$\approx 55 \text{ mol L}^{-1}$	C_0	$8C_0$

No solvoácido no nivelado



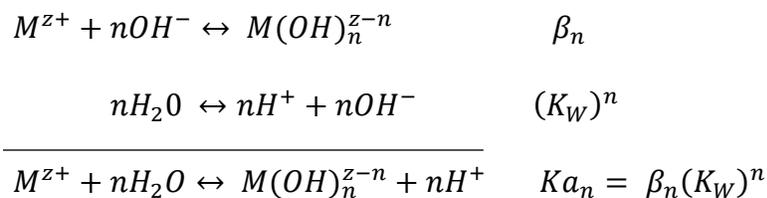
Inicio	C_0	55 mol L^{-1}		
Equilibrio	$(1 - \alpha)C_0$	55 mol L^{-1}	αC_0	αC_0

Pero en la literatura química es más común encontrar las constantes de equilibrio globales correspondientes a la formación de compuestos de coordinación tipo hidróxidos solubles (β_n) como se muestra en la ecuación 4.2.



$$\beta_n = \frac{[MOH_n^{z-n}]}{[M^{z+}][OH^-]^n} \quad (4.2)$$

En acuerdo con la relación de aditividad de la ley de Hess entre los equilibrios de acidez, de formación de compuestos de coordinación y la autoprotólisis del agua se pueden calcular los valores de pK_a de las respectivas hidrolisis ácidas sucesivas de los cationes metálicos en agua como se muestra a continuación^[97].



Donde Ka_n es la constante de acidez global del par $M^{z+} / M(OH)_n^{z-n}$.

Como se mencionó anteriormente, el cobre se comporta en disolución acuosa como un solvoácido no nivelado y al ser el catión de interés a estudiar se muestran los diagramas de diferencia de potencial como función del pH (diagrama de Pourbaix) y de fracción de molar especie ($\Phi_{ML_i} = \Phi_M \sum_i^n \beta_i [L]^i$) también en función del pH para este metal (figuras 4.1 y 4.2), que muestran la distribución de las diferentes especies de Cu(II) en disolución^[98 - 100].

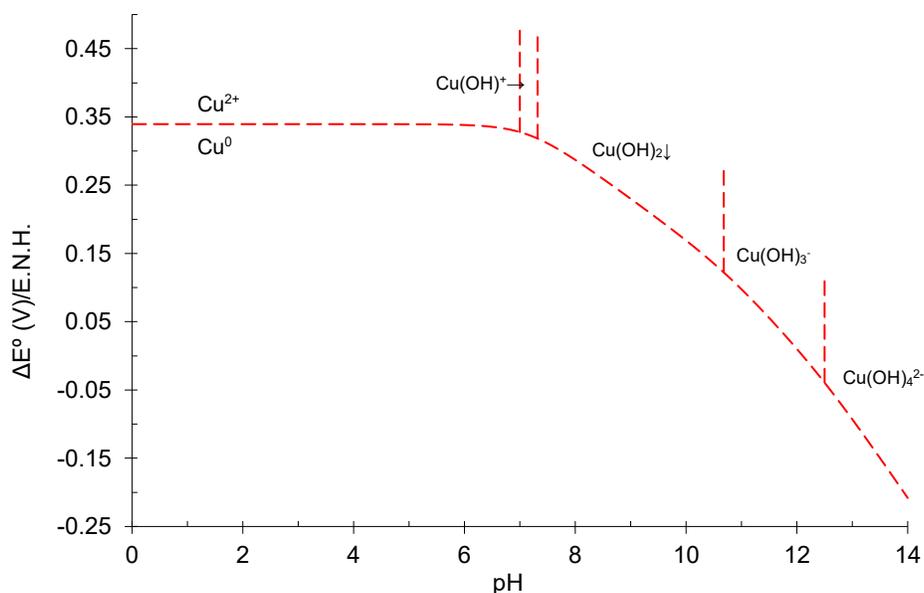


Figura 4.1. Diagrama de potencial normal como función del pH para el sistema Cu⁰/Cu(I)/Cu(II).

Tanto en la figura anterior como en la 4.2 se puede observar que a valores de pH por debajo de 5 el Cu(II) se encuentra prácticamente libre. A partir de pH = 7 la especie soluble Cu(OH)⁺ comienza a tomar importancia y entre pH de 7.3 la aparición del hidróxido insoluble empieza a hacerse notar hasta valores de pH = 10 donde prácticamente el 60% de cobre en disolución está formando la especie Cu(OH)₂↓. Después del pH = 10 comienza a redisolverse el cobre en forma de hidróxidos solubles coordinado con 3 y 4 iones OH⁻.

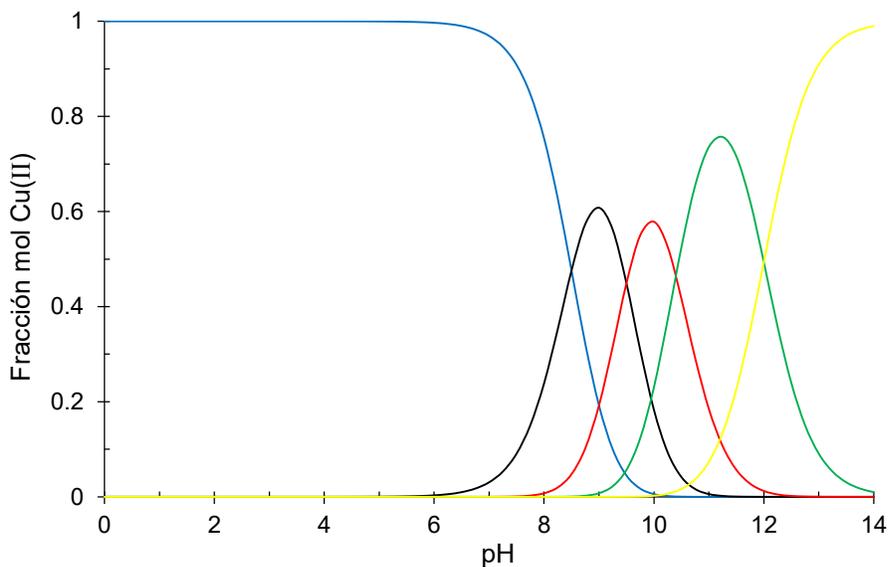


Figura 4.2. Abundancia relativa de los compuestos de coordinación hidróxido de Cu(II). Cu^{2+} azul, $\text{Cu}(\text{OH})^+$ negro, $\text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow$ rojo, $\text{Cu}(\text{OH})_3^-$ verde y $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$ amarillo.

El medio amortiguado con el que se trabajó se preparó con la sal de Tris que es el nombre abreviado de tris(hidroximetil)aminometano, su estructura se muestra en la figura 4.3 es ampliamente usado para generar medios acuosos a pH fisiológico^[101]. Tiene un pK_a de 8.17 ± 0.04 en agua^[102-105] por lo que su capacidad amortiguadora ($\left(\frac{\delta C_{HA}}{\delta pH}\right) = \beta$) está entre los valores de pH de 7 a 9 como se muestra en la gráfica de la figura 4.4 de la capacidad amortiguadora de esta sal^[106], la cual fue construida a la concentración con la que se trabajó en este proyecto, 0.1 mol L^{-1} , misma que fue llevada al pH deseado (7.4) agregando HCl concentrando por lo que se denominara como Tris-HCl.

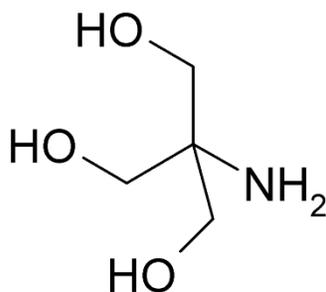


Figura 4.3. Estructura química del 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol en su forma desprotonada, L.

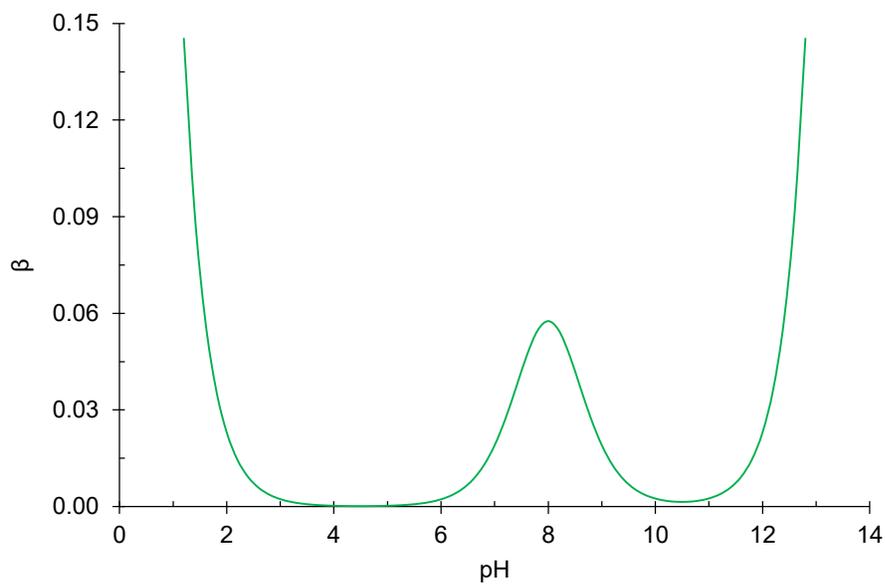


Figura 4.4. Capacidad amortiguadora de una disolución 0.1 mol L⁻¹ Tris.

La sal de Tris en disolución interactúa de manera débil con cationes metálicos divalentes como el Mg²⁺, Ca²⁺ o Mn²⁺[111]. Pero por el contrario tiene la capacidad de formar diversas especies de compuestos de coordinación con bastantes metales de transición en disolución como el Ni(II), Zn(II), Ag(I), Co(II), Cd(II) y Cu(II)^[102-111]. La especie formada en disolución dependerá de manera importante del pH de ésta, el cual se modificará por la concentración de la sal de Tris y del catión metálico. Sobre todo con el Cu(II), existe una gran cantidad de información de las constantes de formación y estequiometrias de los compuestos de coordinación de este catión con el Tris y desafortunadamente no están en acuerdo. En 2013 Najaj y colaboradores realizaron un trabajo muy completo, donde mediante técnicas de potenciometría, espectrofotometría ultravioleta y visible, espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica y espectrometría de masas por ionización con electroespray determinaron todas las posibles especies de Cu(II)-Tris en disolución como función del pH^[111]. En ese trabajo se muestra un diagrama de distribución de especies de compuestos de coordinación Cu(II)-Tris como función del pH, el cual se reproduce en la figura 4.5 a). En esta gráfica se pueden observar al menos ocho especies distintas, además del cobre libre, la especie de Tris protonada en la amina primaria y la base conjugada de este. A pH = 7.4 se observan al menos ocho de todas las especies posibles. En la figura 4.5 b) se muestra el

mismo diagrama pero a las concentraciones 1 mmol L^{-1} de Cu(II) y 100 mmol L^{-1} de Tris las cuales son las que se usaron con mayor frecuencia en este trabajo. Para este caso a $\text{pH} = 7.4$ solo predominan tres especies $\text{CuH}_{-1}\text{L}_2^+$, $\text{CuH}_{-2}\text{L}_2^+$ y $\text{CuH}_{-1}\text{L}^+$. En la tabla 4.1 se muestran las constantes de formación para todas estas especies^[111].

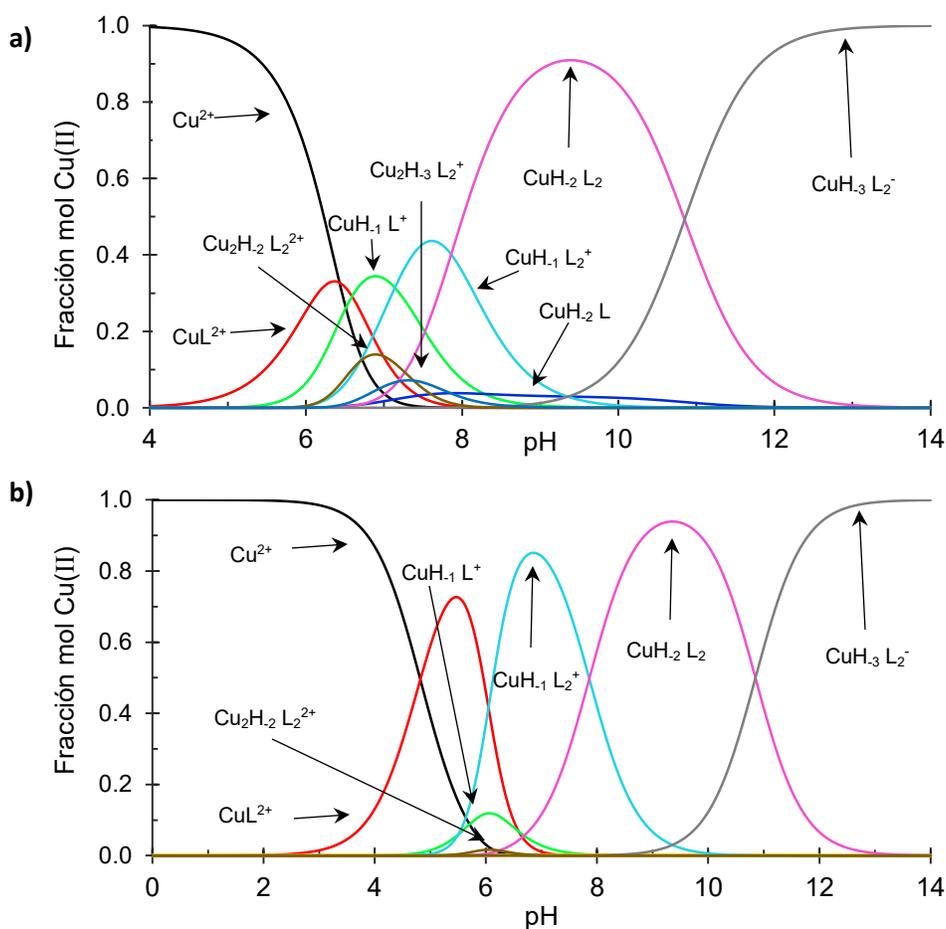


Figura 4.5. Diagramas de distribución de especies de compuestos de coordinación calculados para: a) 2.5 mmol L^{-1} de Tris y 1 mmol L^{-1} de Cu(II) y b) 100 mmol L^{-1} de Tris y 1 mmol L^{-1} de Cu(II) con base en las constantes mostradas en las tabla 4.1 determinadas a 25°C y $I = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ^[111].

Tabla 4.1. Constantes de estabilidad de los compuestos de coordinación Cu(II) -Tris determinadas por potenciometría a 25°C y $I = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ^[111].

HL	CuL^{2+}	$\text{CuH}_{-1}\text{L}^+$	CuH_{-2}L	$\text{CuH}_{-1}\text{L}_2^+$	$\text{CuH}_{-2}\text{L}_2$	$\text{CuH}_{-3}\text{L}_2^-$	$\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2^{2+}$	$\text{Cu}_2\text{H}_{-3}\text{L}_2^+$
8.19	4.37	-2.22	-10.51	1.47	-6.39	-17.24	-1.67	-9.05

¿Qué implicaciones tiene esta situación sobre el estudio de la formación de especies metal-proteína? Los cationes metálicos se unen a las proteínas formando enlaces de coordinación con átomos de nitrógeno y/u oxígeno de los residuos de aminoácidos de la proteína^[108, 112, 113]. Por lo tanto, si el catión metálico ya está formando enlaces de coordinación en disolución con el medio usado y lo que es de interés a es estudiar es la unión del metal con la proteína, entonces las especies químicas del medio se convierten en un competidor con los sitios de unión en la proteína, por lo que la unión dependerá de la magnitud de las constantes de formación. Si este hecho no es tomado en cuenta los parámetros termodinámicos de la formación de estos enlaces podrían estar mal estimados como en el caso donde una constante de formación fue sobre estimada con un orden de magnitud de 10^4 ^[111].

A todo lo discutido anteriormente se le tiene que añadir el comportamiento ácido-base en disolución de los cationes metálicos. Si se trabaja con una concentración elevada del catión (10 mmol L^{-1}), como se acostumbra en los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica, esto puede romper la capacidad amortiguadora del medio y disminuir considerablemente el pH de la disolución lo que provocará que la proteína no se encuentre en su estado nativo y lo que se esté observando no necesariamente es lo que ocurrirá *in vivo*. Por esta razón se midió el pH del agua con la que se prepararon todas las disoluciones, el medio acuoso elegido para los estudios y un par de disoluciones de Cu(II) y Casiopeína III-ia en un medio no amortiguado, para ver qué efecto tienen estas especies sobre el pH (figura 4.6). Se puede ver de primera instancia que el agua desionizada con la que se trabajo tiene un pH ácido de 5.82 ± 0.23 , al hacer la adición del KCl para fijar fuerza iónica y funcionar como electrolito soporte para los estudios electroquímicos no existe un cambio en el valor del pH. Pero cuando se tiene la disolución de cobre en concentración 1 mmol L^{-1} la disolución ahora tiene un $\text{pH} = 5.37 \pm 0.03$ disminuyendo en 0.45 unidades pero al preparar una disolución de Cu(II) 10 mmol L^{-1} el pH baja hasta 4.73 ± 0.05 disminuyendo en 1.09 unidades, lo que está indicando la presencia de la formación de hidróxidos solubles de cobre. Para el caso de la Casiopeína el efecto es distinto, esta basifica la disolución de KCl tiendo un

valor de 6.87 ± 0.13 y 6.86 ± 0.03 para una concentración de 1 y 10 mmol L^{-1} , respectivamente. Aumentando el valor del pH del medio en 1.16 unidades.

También se midió el pH de la disolución que simula condiciones fisiológicas como función de la concentración tanto de Cu(II) como de Casiopeína III-ia mismos que se muestra en la gráfica de la figura 4.7. En este caso se puede observar para el caso del Cu(II) que a concentraciones por debajo de 2 mmol L^{-1} el medio conserva su valor de pH pero por encima de esta existe una disminución importante del pH hasta de dos unidades.

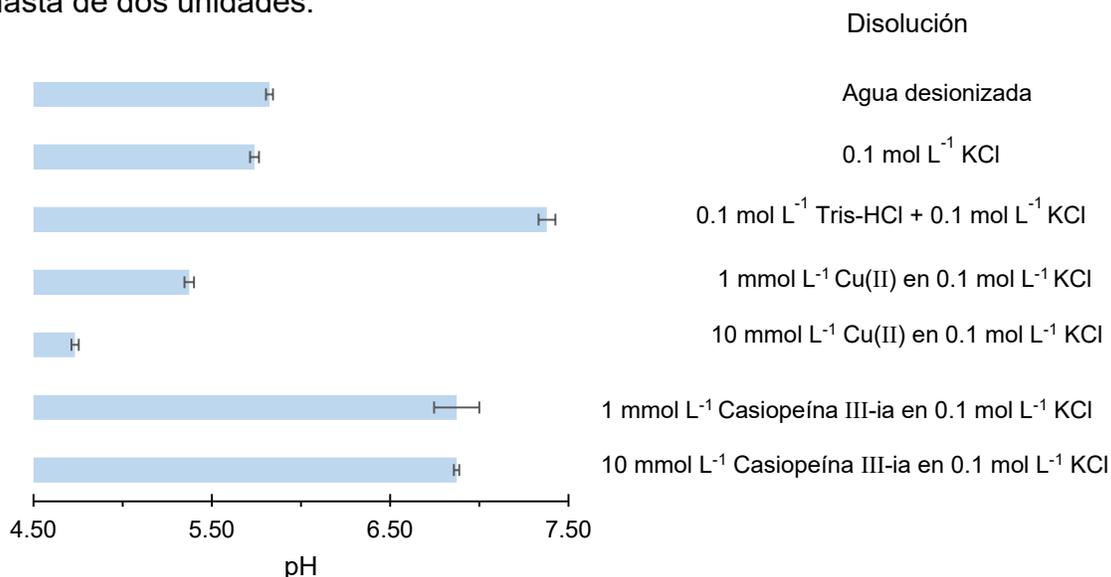


Figura 4.6. Valor de pH de los medios acuosos de trabajo.

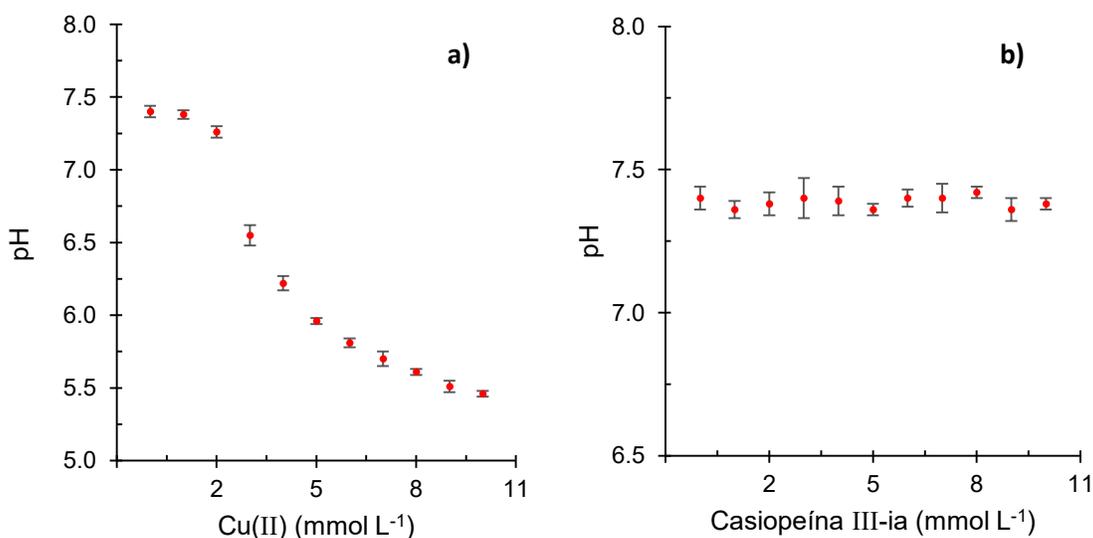


Figura 4.7. pH en función de la concentración de a) Cu(II) y b) de la Casiopeína III-ia en la disolución 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl ajustada a pH = 7.4.

Este cambio en pH se puede explicar tanto por la formación de especies de hidróxidos solubles de cobre como por el hecho de que al formarse las especies Cu(II)-Tris existen desprotonaciones del Tris. En la literatura están reportadas las posibles estructuras de las especies $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ y $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}_2$, obtenidas mediante estudios de rayos X, en la cuales se observan desprotonaciones en la molécula del Tris^[110, 111]. Si no se tiene cuidado en la selección de la concentración de cobre en disolución se puede cometer el error de no trabajar en un medio amortiguado a las condiciones fisiológicas. Una manera de evitar esto es concentrar más la disolución amortiguadora o simplemente trabajar por debajo de una concentración 2 mmol L^{-1} de Cu(II), que es por lo que se optó en este trabajo para los estudios de la interacción entre este catión metálico y la proteína albúmina sérica humana.

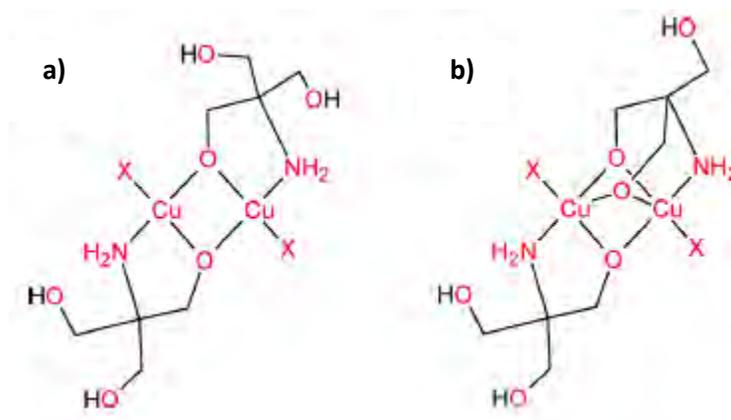


Figura 4.8. Estructuras probables de a) $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ y b) $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}_2$. X representa una molécula de disolvente o un contraión^[110, 111].

A diferencia del Cu(II), la Casiopeína III-ia no modifica el valor del pH de la disolución de Tris-HCl en un intervalo de concentraciones desde $0.001 \text{ mmol L}^{-1}$ a 10 mmol L^{-1} , figura 4.7 b), indicando que al menos el valor del pH y la capacidad amortiguadora del medio se mantendrá en este intervalo de concentraciones. Por lo que se puede trabajar en el estudio de la interacción de este metalofármaco como la albúmina en un intervalo más amplio de concentraciones.

4.1.1 Electroquímica

El dominio de electroactividad de la disolución amortiguadora 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl y pH = 7.4, la disolución 0.1 mol L⁻¹ de KCl y la mezcla amortiguador/etanol (90:10) que se usó exclusivamente para obtener el perfil voltamperométrico de la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina se muestran en la figura 4.9. Este fue trazado en un intervalo de potencial de $E_i = 0.0$ V (inicial), $E_{\lambda-} = -1.5$ V (inversión negativo) y $E_{\lambda+} = 1.2$ V (inversión positivo) $E_f = 0.0$ V (final), así como en el sentido contrario $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda+} = 1.2$ V, $E_{\lambda-} = -1.5$ V y $E_f = 0.0$ V.

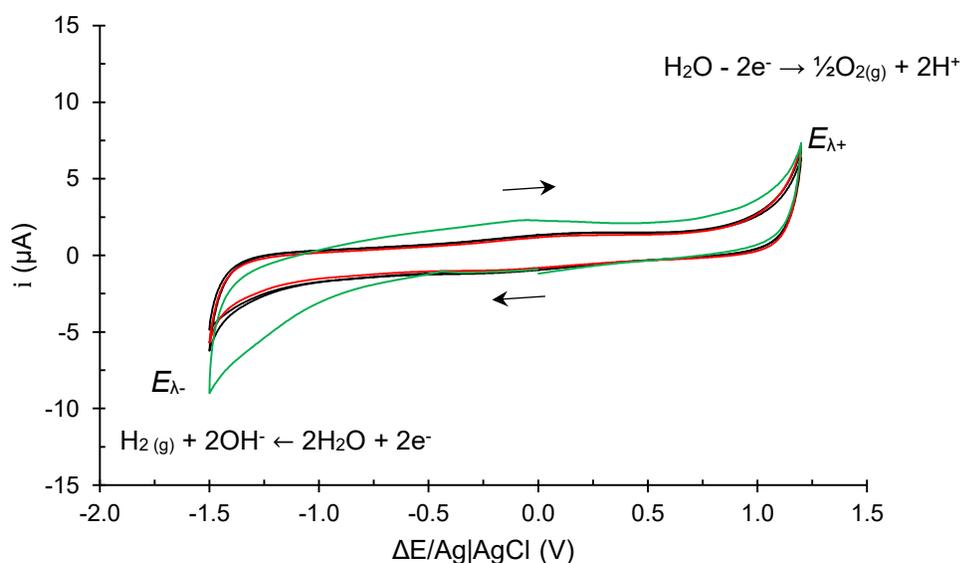


Figura 4.9. Dominio de electroactividad de la disolución amortiguadora 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 (negro), disolución 0.1 mol L⁻¹ de KCl (verde) y mezcla medio amortiguado/etanol 90:10 (rojo), todos a una velocidad de barrido de 0.05 V s⁻¹ y usando un electrodo de trabajo de carbón vítreo.

Se puede observar que los voltamperogramas del amortiguador y la mezcla amortiguador/etanol se empalman en ambas direcciones, lo que demuestra que el añadir un 10% de etanol a la disolución no modifica el perfil del dominio de electroactividad. Para el caso del dominio de electroactividad de la disolución de KCl se observan que este dominio tiene una mayor corriente capacitiva en corrientes positivas, lo cual se puede atribuir a que la doble capa eléctrica cargada no es la misma en ambas disoluciones. Se observa también, una corriente mayor a la del

medio amortiguado y la mezcla a partir de un potencial de -0.5 V y hasta la barrera catódica, la cual se debe a que la disolución tiene una concentración de ion hidronio $[H^+] = 1.95 \mu\text{mol L}^{-1}$ y la reducción de éste a hidrógeno gas es lo que se observa ahí. El perfil de esta reducción se debe a que la cinética de reducción del hidronio es lenta sobre carbón vítreo. Si la concentración del hidronio fuera más alta o la reacción electroquímica se estuviese llevando a cabo sobre platino la reducción del hidronio incluso podría convertirse en la barrera catódica. Las barreras de electrólisis limitan la máxima ventana de electroactividad con un $\Delta E = 2.7$ V. Aunque el mejor intervalo para el desarrollo del trabajo se establece en 1.0 V para la barrera anódica y -1.3 V para la barrera catódica ($\Delta E = 2.3$ V). Debido a las condiciones experimentales y las especies químicas en disolución, la barrera catódica está limitada por la reducción de la molécula de agua e iones H^+ y la barrera anódica por la oxidación de la molécula de agua como se muestra en la figura anterior. Ahora bien en la figura 4.10 se muestra el perfil voltamperométrico del Cu(II) en la disolución de Tris-HCl a una concentración de 1 mmol L^{-1} .

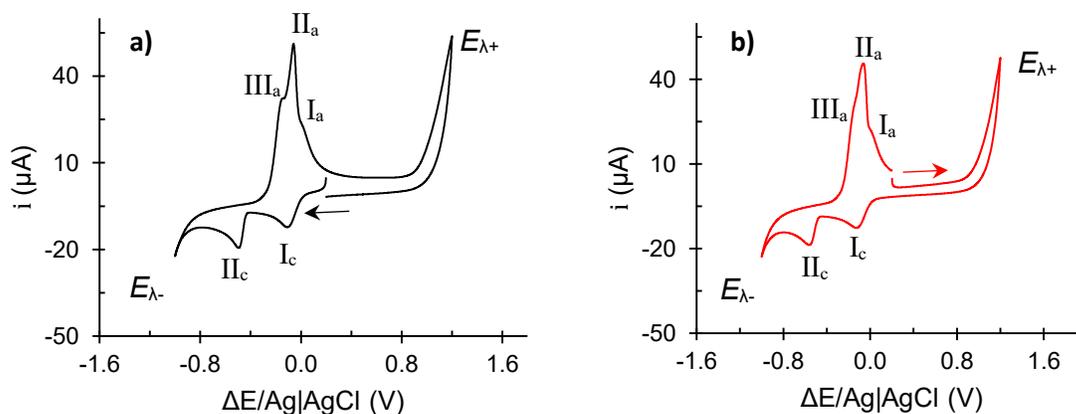


Figura 4.10. Perfil voltamperométrico del Cu(II) a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. Los voltamperogramas se trazaron a una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} . a) Es el voltamperograma trazado en dirección de potenciales negativos y b) en dirección de potenciales positivos. Ambos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) y usando un electrodo de trabajo de carbón vítreo.

En la figura anterior se puede observar que sin importar en qué dirección se hacen los barridos las señales que se observan son las mismas, por lo que solo se trabajó con los voltamperogramas trazados en dirección de potenciales negativos. Además

de las barreras se observan dos señales de reducción I_c y II_c así como las oxidaciones I_a , II_a y III_a . Estas últimas están muy cercanas y el perfil de las señales I_a y II_a donde se observa un aumento rápido de corriente con respecto a las señales de reducción indica que existe una redisolución de cobre metálico adsorbido sobre el electrodo de trabajo^[61]. A pesar de la existencia de varias especies de Cu(II)-Tris, como ya se mencionó antes, solo se observa una señal debido a que todas las especies se encuentran en equilibrio en la disolución entonces cuando la especie predominante ($CuH_{-1}L_2^+$) se reduce el equilibrio químico se desplaza hacia esta especie predominante. Las posiciones de las señales observadas son -0.102 y -0.493 V/ $Ag^+/AgCl_{(s)}$ para las señales I_c y II_c respectivamente. Para las señales de oxidación I_a , II_a y III_a tenemos -0.163, -0.058 y 0.025 V/ $Ag^+/AgCl_{(s)}$ respectivamente. Para asignar de manera adecuada las señales observadas se hizo un estudio reduciendo el potencial de inversión (E_{λ^-}), resultados que se muestran en la figura 4.11.

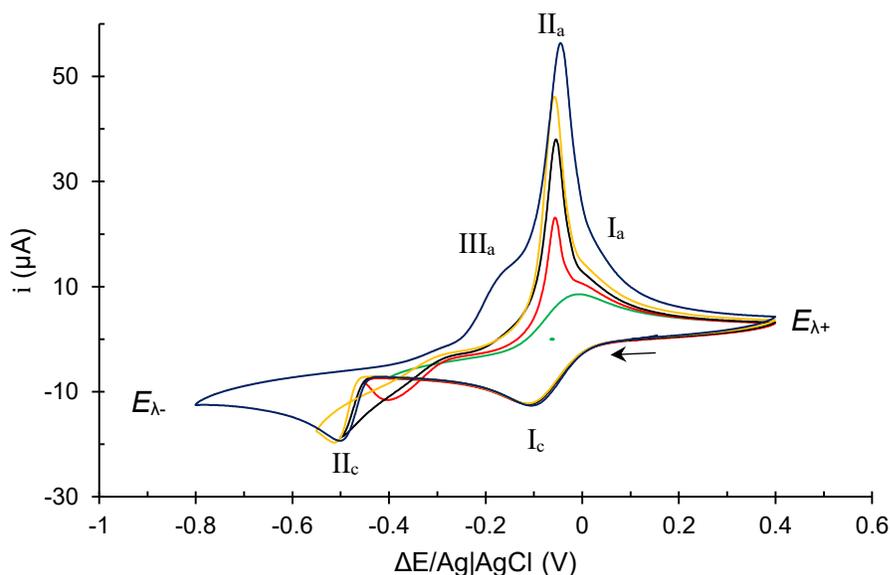


Figura 4.11. Perfiles voltamperométricos del Cu(II) a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. Utilizando un electrodo de trabajo de carbón vítreo. A una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) cambiando el valor del potencial de inversión negativo (E_{λ^-}) de -0.400, -0.450, -0.500, -0.550 y -0.800 V.

Se puede observar en la figura anterior que el pico de reducción I_c se mantiene en la misma posición y magnitud en todos los voltamperogramas. Por lo que esta señal debe ser asociada al proceso de reducción del centro metálico de Cu(II) a Cu(I) con una posición de potencial de $E_p^c = -0.098 \pm 0.004 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$. Para el caso de la señal II_c , comienza a aparecer desde los -0.450 V como potencial de inversión y está asociada al proceso electroquímico Cu(I) a Cu^0 con una posición de potencial de $E_p^c = -0.500 \pm 0.005 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$. Esta señal provoca también la aparición de la señal etiquetada como II_a , la cual pertenece al proceso electroquímico de la redisolución de la reacción electroquímica anterior en un $E_p^a = -0.052 \pm 0.006 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$. En un potencial de inversión de -0.800 V se puede observar una nueva señal, etiquetada en la figura anterior como III_a la cual puede ser debida a la oxidación de una especie de Cu(I) distinta en ligantes a la formada en la señal II_c . Esta última señal se encuentra a un $E_p^a = -0.176 \pm 0.002 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$.

Las señales de interés a estudiar son las únicas que ocurren en fase homogénea, porque la interacción entre el Cu(II) y la albúmina humana de manera cuantitativa se analizará en esta fase. Por lo tanto se estudiaron con mayor detalle las señales I_c y I_a . Primero haciendo diez barridos seguidos en el intervalo de barrido de potencial de -0.400 a 0.400 V , para observar que en esta zona no hay adsorción de ninguna especie de cobre sobre el electrodo de trabajo que pudiese estar afectando los demás procesos. En la figura 4.12 se muestran los resultados de este experimento donde se puede observar que no existe diferencia entre el ciclo 1 y el 10. No existe una disminución de corriente o desplazamiento de los picos de potencial. Con este resultado se realizó un estudio en este intervalo de potencial como función de la velocidad de barrido. Los resultados se muestran en la figura 4.13, en a) se muestran los voltamperogramas a las diferentes velocidades de barrido y en b) las gráficas de $i_p = f(v^{1/2})$ las cuales para ambos procesos electroquímicos se ajustan a una línea recta. Para la reducción $i_p^c = -32.92 v^{1/2} - 2.29$ ($r^2 = 0.9975$) y para la oxidación $i_p^a = 28.57 v^{1/2} + 1.97$ ($r^2 = 0.9965$). Que como se puede ver ambos procesos tienen un buen coeficiente de correlación lineal.

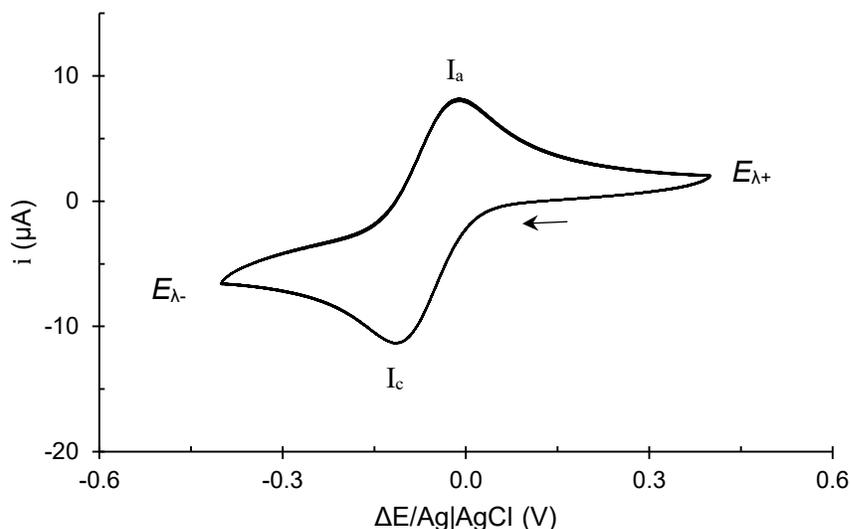


Figura 4.12. Perfil voltamperométrico de 10 ciclos seguidos de $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cu(II)}$ en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte y utilizando un electrodo de trabajo de carbón vítreo. A una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) y en un intervalo de potencial de -0.400 a 0.400 V .

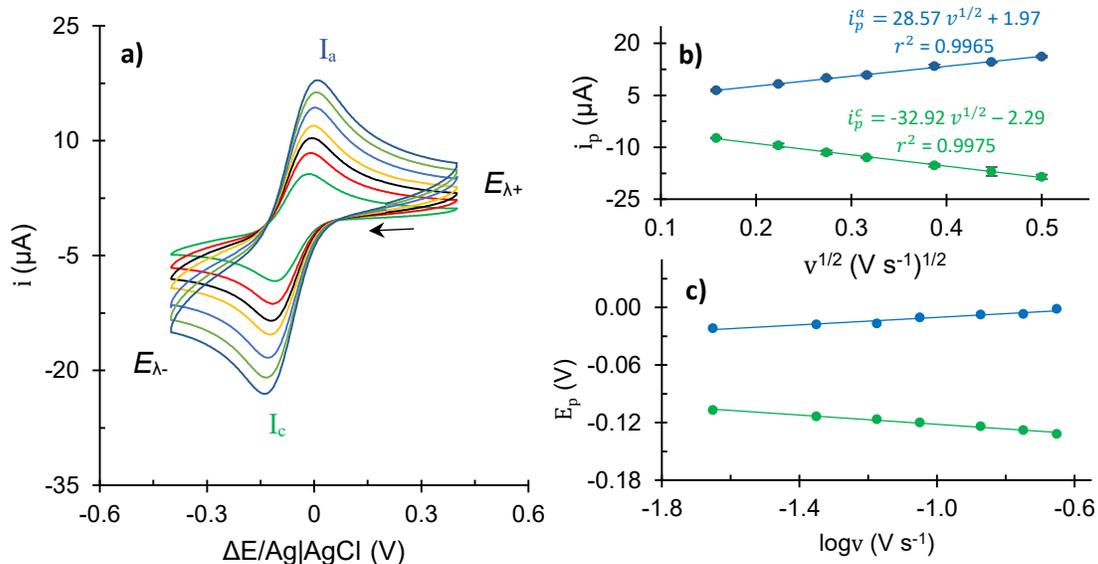


Figura 4.13. a) Voltamperogramas cíclicos en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) de $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cu(II)}$ en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte, utilizando un electrodo de trabajo de carbón vítreo y variando la velocidad de barrido 0.025 , 0.050 , 0.075 , 0.100 , 0.150 , 0.200 y 0.250 V s^{-1} . b) Gráficos de $i_p = f(v^{1/2})$ para los procesos electroquímicos I_c y I_a . c) Gráficos de $E_p = f(\log v)$.

Para la oxidación el análisis de la figura 4.13 b) no es del todo correcto, porque esta ecuación (2.2) está definida para concentración en disolución y la especie que se electrooxida no se encuentra en disolución. Si no que se transforma al electrodo, aun así indica que el proceso está controlado por difusión^[61], al menos a estas condiciones y velocidades de barrido. Adicionalmente se construyeron las gráficas de $i_p = f(v)$ (no se muestran en este trabajo) en las cuales los coeficientes de correlación lineal fueron más pobres con un $r^2 = 0.9353$ para la electroreducción y $r^2 = 0.8932$ para la electrooxidación, lo que sugiere que en estas condiciones el proceso no presenta adsorciones sobre el electrodo de trabajo. En la gráfica de la figura 4.13 c) se observa que el perfil de las curvas $E_p = f(\log v)$ pertenece al de un sistema cuasi reversible^[61]. Del estudio realizado en la figura 4.13 se pueden obtener diversos parámetros electroquímicos como el $E_{1/2} = -0.066 \pm 0.001$ V, un valor aproximado del coeficiente de difusión a partir de la pendiente de la ecuación de Randles-Sevcik^[61] (2.2), el cual para especie oxidante es $D_{ox} = 2.98 \times 10^{-6} \pm 0.35 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ y para la especie reductora $D_{red} = 2.24 \times 10^{-6} \pm 0.23 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹. Estos valores de coeficientes de difusión son aproximados debido a que la resistencia de la disolución solo puede ser compensada en un 80% y el sistema es cuasi reversible, lo que provoca un error en estas estimaciones. La relación de coeficientes de difusión es 1.32, valor que obedece a la relación de corrientes de pico $i_p^c/i_p^a = 1.19 \pm 0.04$, obtenida de todos los experimentos de la figura 4.13 a). El que los valores de coeficientes de difusión de cada especie no sean iguales es debido a que los compuestos de coordinación de Cu(II) tienen una geometría e inclusive número de coordinación distintos a los de Cu(I), por lo que cuando la especie de Cu(II) es reducida se modifica tanto la esfera de coordinación como la de solvatación para la especie de Cu(I) generando un cambio significativo entre los parámetros electroquímicos de cada una.

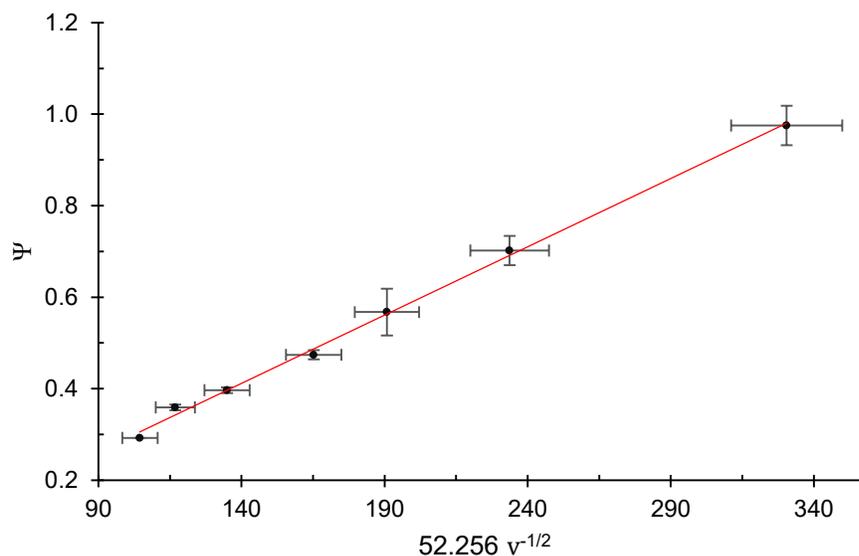


Figura 4.14. Función Ψ como función de $52.256v^{1/2}$ de la reducción de 1 mmol L^{-1} de Cu(II) en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. El factor 52.256 representa la cantidad $[\pi D_{ox} n(F R^{-1} T^{-1})]$.

Realizando un análisis de datos de acuerdo a lo propuesto por Lavagnini^[67] con la ecuación 2.12, la cual se representa como una línea recta de ecuación $\Psi = 3.11 \times 10^{-3} \times 52.256v^{-1/2} - 6.10 \times 10^{-3}$ ($r^2 = 0.9977$) en la figura 4.14, se puede obtener de la pendiente la constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones $k^0 = 3.11 \times 10^{-3} \pm 0.51 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$. Para comparar estos resultados obtenidos de manera experimental también se realizaron varios ajustes de los voltamperogramas de la figura 4.13 a) con el software EC-Lab V11.01 (mismo que controla el potencióstato/galvanostato utilizado) el cual tiene una opción para ajustes de voltamperogramas cíclicos. En la figura 4.15 se muestra el ejemplo para el voltamperograma a 0.100 V s^{-1} , con el cual se obtuvo un χ^2 (chi-cuadrada) de 0.002 mismo orden de magnitud que se mantuvo para todos los ajustes, aunque este valor podría considerarse bueno se puede observar en el gráfico que no es un buen ajuste y esto se debe a lo mencionado anteriormente sobre los cambios de geometría y de solvatación entre las especies reducida y oxidada y que el software no puede simular. A pesar de esto los parámetros obtenidos de este ajuste son: $E_{1/2} = E^{0'} = -0.035 \pm 0.007 \text{ V}$, $D_{ox} = 11.05 \times 10^{-6} \pm 0.66 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{red} = 1.59 \times$

$10^{-6} \pm 0.18 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0.35 \pm 0.08$ (parámetro que indica la simetría del voltamperograma, entre más cercano sea a 0.5 más simétrico será^[61]) y $k^0 = 2.37 \times 10^{-3} \pm 0.45 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$.

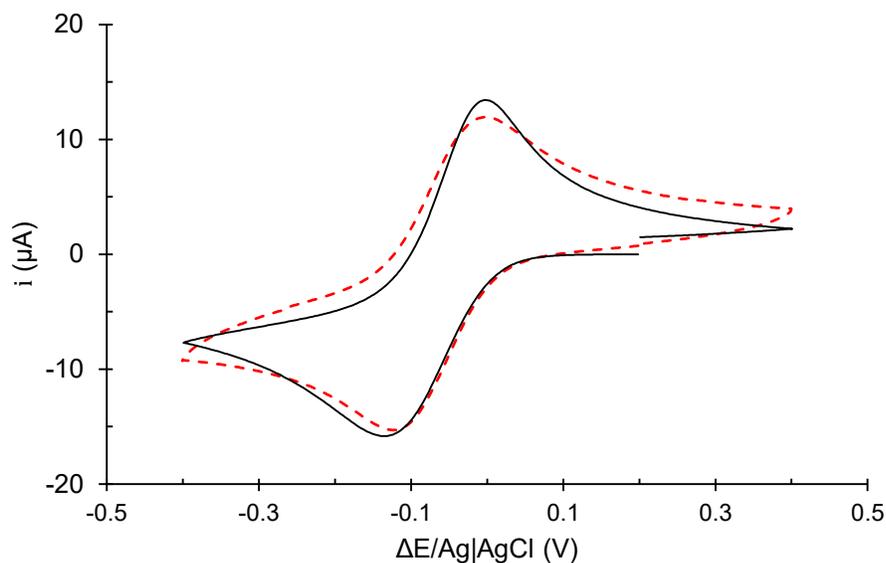


Figura 4.15. Voltamperograma cíclico de la reducción de 1 mmol L^{-1} de Cu(II) en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 como electrolito soporte desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}), utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo y a una velocidad de barrido de 0.100 V s^{-1} (discontinuo en rojo) y ajuste al voltamperograma experimental (continuo en negro).

Para continuar con la caracterización del sistema también se realizaron experimentos de cronoamperometría para determinar el coeficiente de difusión de la especie oxidante y comprobar mediante otra técnica que en las condiciones que se trazaron los voltamperogramas de la figura 4.13 no existe adsorción sobre el electrodo de trabajo. En la figura 4.16 a) se muestra el cronoamperograma de doble pulso. Donde se mandó un pulso de potencial de -0.400 V y un segundo de 0.400 V durante 5 segundos cada uno. En la figura 4.16 b) se muestra el análisis de resultados del primer pulso de potencial de acuerdo con la ecuación de Cottrell (2.14) $i = f(t^{-1/2})$ misma que se ajusta a una línea recta de ecuación $i = -2.64 \times 10^{-5}t^{1/2} - 3.66 \times 10^{-6}$ ($r^2 = 0.9978$). A partir de la pendiente de esta recta se puede obtener el coeficiente de difusión de la especie oxidante, el cual tiene un valor

promedio para tres experimentos independientes de $D_{ox} = 12.99 \times 10^{-6} \pm 0.09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

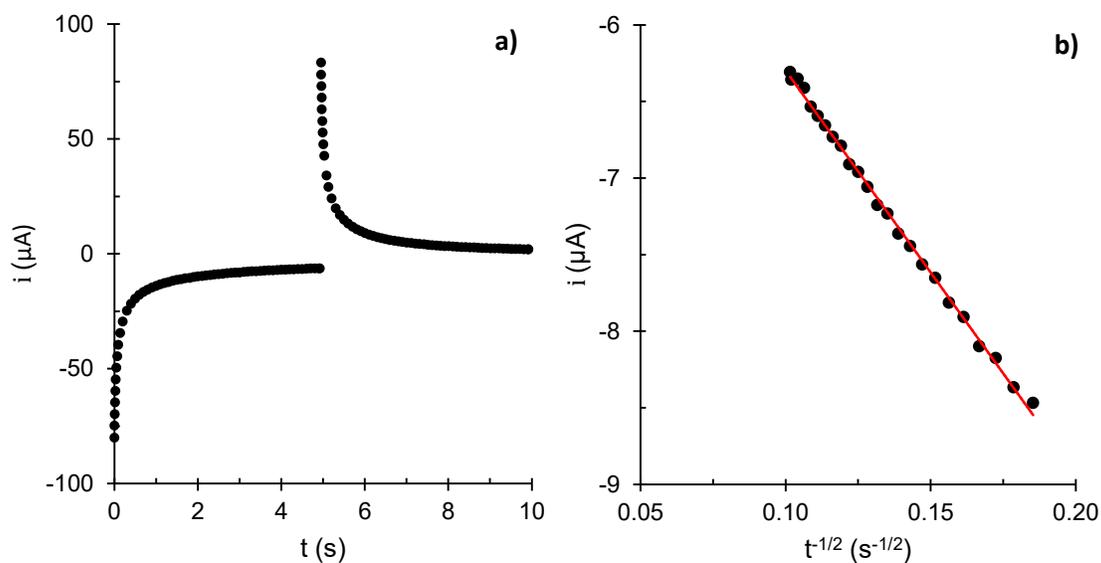
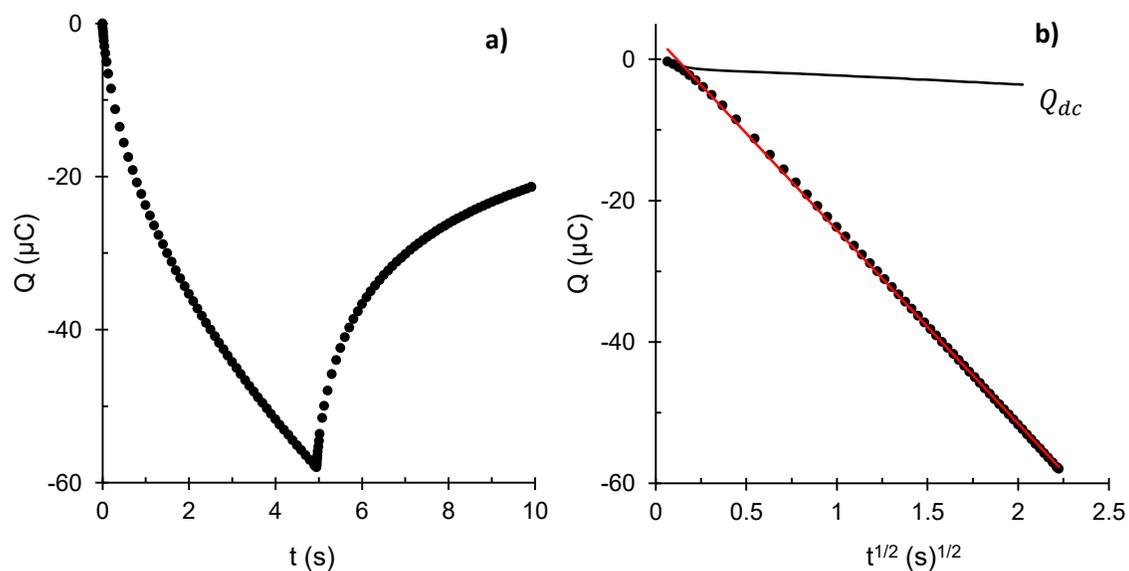


Figura 4.16. a) Cronoamperograma de doble pulso de potencial de 1 mmol L⁻¹ de Cu(II) en el amortiguador 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 como electrolito soporte y b) grafica de $i = f(t^{-1/2})$ (círculos negros) y el ajuste lineal (línea roja) para el primer pulso de potencial.



4.17. a) Carga como función del tiempo construida del cronoamperograma de la figura 4.16 a) y b) carga como función de la raíz cuadrada del tiempo para el primer pulso de potencial de la cronoamperometría de la figura 4.16 a) (círculos), el ajuste lineal (línea continua roja) y la carga de la doble capa eléctrica del medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 (línea continua negra).

A partir del cronoamperograma se puede construir una gráfica de carga ($Q = it$) como función del tiempo, $Q = f(t)$, para saber si existe alguna carga de adsorción sobre el electrodo de trabajo^[114, 115]. En la figura 4.17 a) se muestra la gráfica $Q = f(t)$ para los dos pulsos enviados al sistema en la cronoamperometría. En la gráfica b) de la misma figura, se muestra la gráfica de $Q = f(t^{1/2})$, solo para el primer pulso de potencial para la disolución 1 mmol L^{-1} de Cu(II), el cual tiene un comportamiento lineal descrito por la curva $Q = -27.38t^{1/2} + 3.21$ ($r^2 = 0.9995$) y para el medio amortiguado a pH = 7.4 (la cual se estimó haciendo el mismo experimento de cronoamperometría únicamente con el medio amortiguador) que mantiene una carga aproximadamente constante e intersecta con el valor para la disolución de Cu(II) indicando que no existe una carga adicional por adsorción en estas condiciones.

Adicionalmente y a manera de desmostar que el cobre en disolución de Tris y en agua se comporta de distinta forma, se realizó un estudio similar para el cobre disuelto únicamente en 0.1 mol L^{-1} de KCl como electrolito soporte. En la figura 4.18 se pueden observar las señales de los procesos electroquímicos presentes en todo el dominio de electroactividad. La barrera catódica se ve disminuida hasta -1.0 V , 0.5 V menos con respecto a lo observado en la disolución de KCl de la figura 4.9. Esto se debe a que la adición de cobre a la disolución acidifica el medio hasta tener una concentración de ion hidronio de más del doble de la original ($[\text{H}^+] = 4.27 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Entonces lo que se observa como barrera catódica es la reducción del H^+ a hidrógeno gas. Además de las barreras, cuando el barrido se realiza en sentido de potenciales negativos se observan tres señales de reducción I_c , II_c y III_c con posiciones de picos de 0.076 , -0.331 , y $-0.847 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, respectivamente. También se observan las oxidaciones I_a , II_a , II_a' y III_a en potenciales de 0.135 , -0.032 , -0.046 y $0.851 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, respectivamente. Al hacer el barrido hacia potenciales positivos se observan algunos cambios en el perfil del voltamperograma. La señal III_c está muy cercana a la barrera y la señal III_a no existe, esto indica que el pico III_a solo se genera después de generarse la especie de la señal III_c . En ambos voltamperogramas para las señales II_a se observa un aumento rápido de corriente con respecto a las señales de reducción, indicando la

redisolución de cobre metálico adsorbido sobre el electrodo de trabajo^[61]. Esta señal tiene un ensanchamiento en la base que indica que existen dos señales traslapadas (II_a' y II_a), que podría deberse también al proceso de la señal III_c .

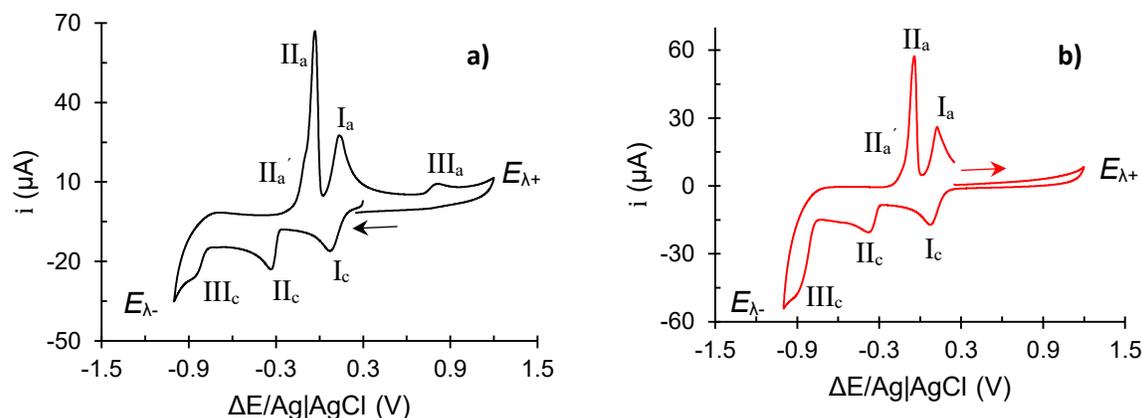


Figura 4.18. Perfil voltamperométrico del Cu(II) a una concentración de 1 mmol L^{-1} en 0.1 mol L^{-1} de KCl como electrolito soporte. Los voltamperogramas se trazaron usando un electrodo de trabajo de carbón vítreo y a una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} . a) Es el voltamperograma trazado en dirección de potenciales negativos y b) en dirección de potenciales positivos. Ambos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}).

Las posiciones de las señales en sentido de potenciales positivos son 0.081 , -0.369 , y $-0.871 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, para las reducciones y 0.124 , -0.044 y $-0.058 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, para las oxidaciones. Las señales I_c y III_c se mantienen aproximadamente en la misma posición, sin importar en qué sentido se haga el barrido, y para II_c hay un desplazamiento hacia potenciales más negativos cuando se hace primero un barrido hacia la barrera anódica. La presencia de Cu(II) disminuye en aproximadamente 0.5 unidades de pH de la disolución de KCl, lo que indica que se evita la formación de hidróxidos solubles de Cu(II) a valores de $\text{pH} < 6$, entonces el Cu(II) se mantiene únicamente coordinado a moléculas de agua. Por lo tanto, las señales I_c y II_c son atribuidas a los procesos electroquímicos de la reducción de $\text{Cu(II)} + 1e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ y de $\text{Cu(I)} + 1e^- \rightarrow \text{Cu(0)}$ respectivamente, y las señales I_a y II_a son sus reacciones electroquímicas contrarias. La señal III_c podría atribuirse a una reacción electroquímica del cobre sobre el nuevo electrodo que se formó por el depósito de Cu(0) de la reacción II_c , de cual se observa su reacción contraria en III_a . La explicación anterior de lo que ocurre en los voltamperogramas de la figura

4.18 es descriptiva, con el único fin de comparar el comportamiento del Cu(II) en el medio acuoso empleado.

Para hacer una mejor comparación de lo que ocurre solo en medio homogéneo se analizaron los procesos I_c y I_a , primero realizando diez ciclos seguidos en el intervalo de barrido de potencial de -0.200 a 0.500 V mostrados en la figura 4.19, donde una vez más se observa que los voltamperogramas se superponen. Por lo que en esta zona no existe la adsorción de ninguna especie de cobre sobre el electrodo de trabajo.

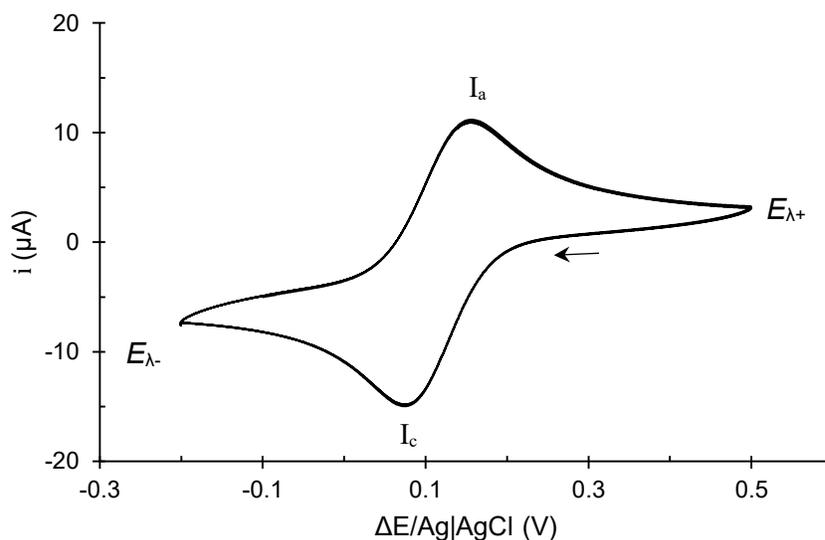


Figura 4.19. Perfil voltamperométrico de 10 ciclos seguidos de 1 mmol L^{-1} de Cu(II) en 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte, Utilizando como electrodo de trabajo carbón vítreo. A una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) y en un intervalo de potencial de -0.200 a 0.500 V.

A partir de este resultado se realizó el estudio como función de la velocidad de barrido, para estos procesos. Los resultados se muestran en la figura 4.20, en a) se muestran los voltamperogramas a las diferentes velocidades de barrido y en b) las gráficas de $i_p = f(v^{1/2})$, las cuales para ambos procesos electroquímicos se ajustan a una línea recta. Para la reducción $i_p^c = -52.16 v^{1/2} - 1.95$ ($r^2 = 0.9988$) y para la oxidación $i_p^a = 51.23 v^{1/2} + 0.38$ ($r^2 = 0.9973$). Con buenos coeficientes de correlación lineal para ambos procesos electroquímicos. Como ya se mencionó para el caso donde el Cu(II) está disuelto en el medio fisiológico para la oxidación el análisis de la figura 4.20 b) no es del todo correcto, pero si indica que los procesos

están controlados por difusión y no existe adsorción sobre el electrodo de trabajo^[61], al menos a estas condiciones y velocidades de barrido. Las gráficas de $i_p = f(v)$ (no mostradas en este trabajo) para este sistema presentaron coeficientes de correlación lineal más pobres con un $r^2 = 0.9397$ para la electroreducción y $r^2 = 0.9476$ para la electrooxidación, comprobando una vez más que en estas condiciones no se presentan adsorciones sobre el electrodo de trabajo. Los parámetros electroquímicos obtenidos de los experimentos de la figura 4.20 son $E_{1/2} = 0.112 \pm 0.001$ V, el coeficiente de difusión para la especie de Cu(II) es $D_{ox} = 7.47 \times 10^{-6} \pm 0.02 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ y para la especie de Cu(I) es $D_{red} = 7.20 \times 10^{-6} \pm 0.01 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹. La relación de coeficientes de difusión es de 1.03 y la relación de corrientes de pico $i_p^c/i_p^a = 1.11 \pm 0.05$, obtenida de todos los experimentos de la figura 4.20 a). En la figura 4.20 c) se muestra la gráfica de $E_p = f(\log v)$ la cual indica, por su perfil, que este sistema tiene un comportamiento cuasi reversible, al igual que cuando el Cu(II) se encuentra disuelto en el medio amortiguado.

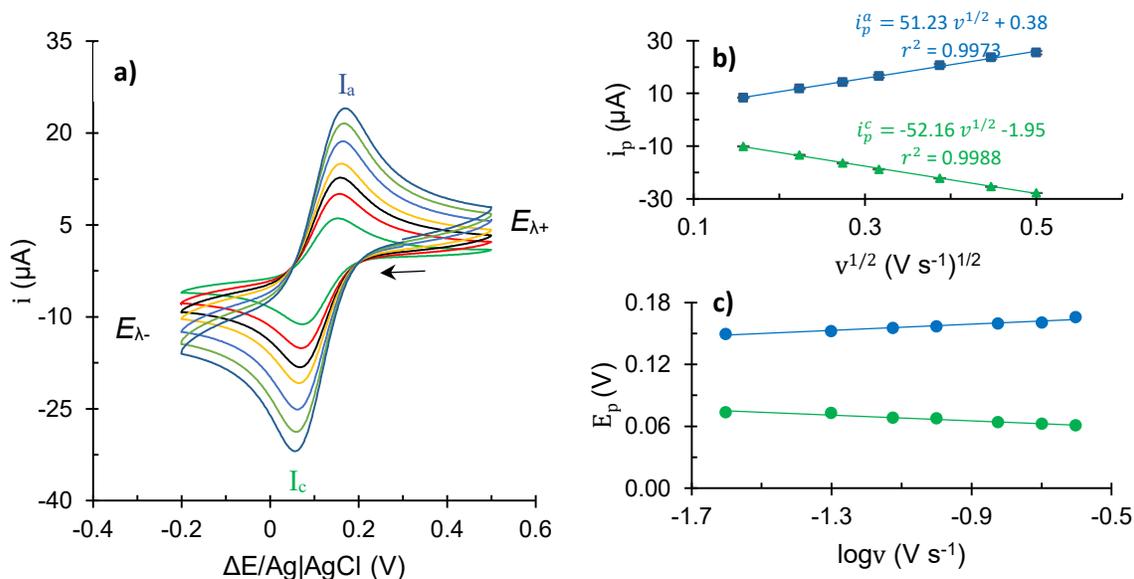


Figura 4.20. a) Voltamperogramas cíclicos en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) de 1 mmol L⁻¹ Cu(II) en 0.1 mol L⁻¹ de KCl como electrolito soporte, usando como un electrodo de trabajo de carbón vítreo y variando la velocidad de barrido 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.150, 0.200 y 0.250 V s⁻¹. b) Gráficos de $i_p = f(v^{1/2})$ para los procesos electroquímicos I_c y I_a . c) Gráficos de $E_p = f(\log v)$.

De los voltamperogramas a distintas velocidades de barrido también es posible hacer un análisis de datos con la ecuación 2.12 para obtener la constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones de la pendiente de la línea recta mostrada la figura 4.21. La cual está representada por la ecuación $\Psi = 7.62 \times 10^{-3} \times 32.919v^{-1/2} - 47.40 \times 10^{-3}$ ($r^2 = 0.9811$), por lo tanto esta constante tiene un valor de $k^0 = 7.62 \times 10^{-3} \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$.

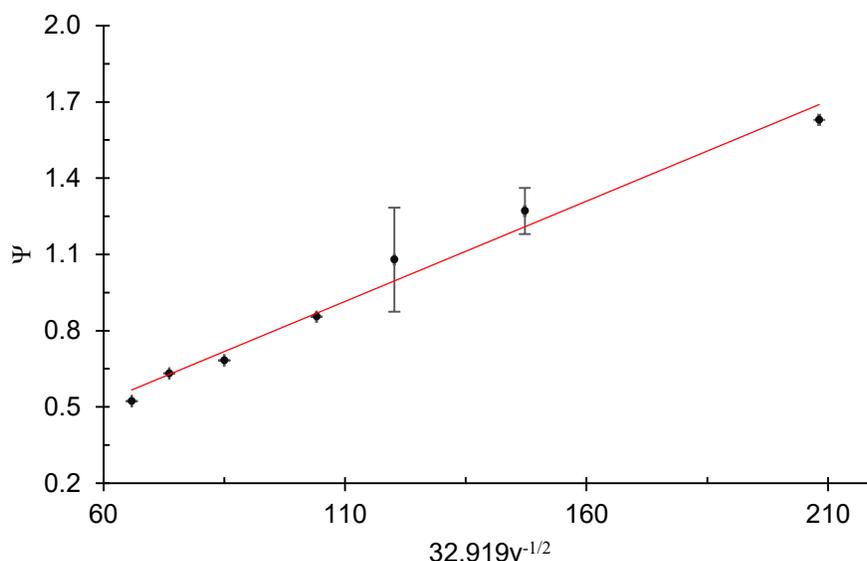


Figura 4.21. Función Ψ como función de $32.919v^{-1/2}$ de la reducción de $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cu(II)}$ en 0.1 mol L^{-1} de KCl como electrolito soporte. El factor 32.919 representa la cantidad $[\pi D_{ox} n (F R^{-1} T^{-1})]$.

Para continuar con la comparación de resultados obtenidos de manera experimental se realizaron también para este sistema los ajustes de los voltamperogramas de la figura 4.20 con el software EC-Lab V11.01. En la figura 4.22 se muestra el ejemplo para el voltamperograma a 0.100 V s^{-1} , para el cual se obtuvo un χ^2 (chi-cuadrada) de 0.2×10^{-3} mismo orden de magnitud que se mantuvo para todos los ajustes. Cabe mencionar que para este sistema el ajuste es mejor que para el caso donde se utiliza como disolvente un medio a $\text{pH} = 7.4$. Los parámetros obtenidos de estos ajustes son: $E_{1/2} = E^0 = 0.132 \pm 0.002 \text{ V}$, $D_{ox} = 15.20 \times 10^{-6} \pm 0.40 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{red} = 14.87 \times 10^{-6} \pm 0.48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0.48 \pm 0.03$ y $k^0 = 5.01 \times 10^{-3} \pm 0.42 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$.

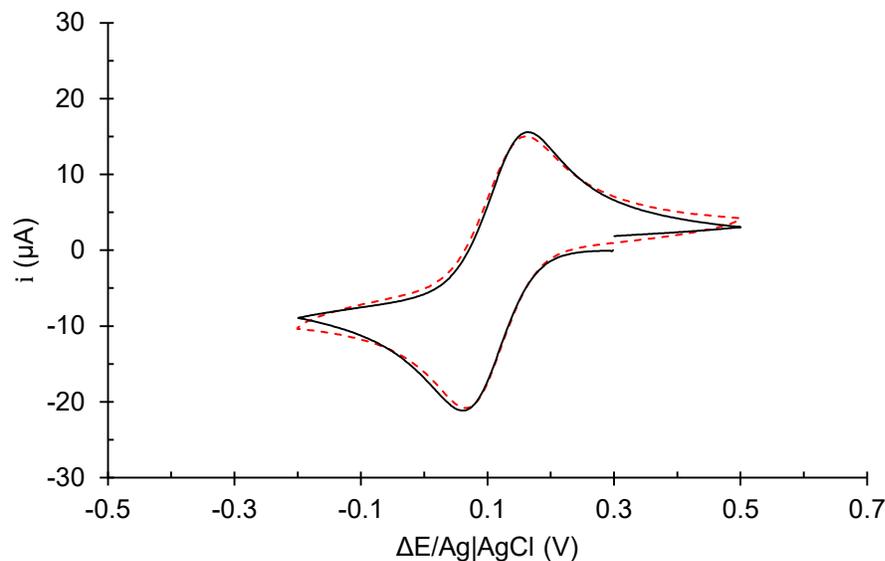


Figura 4.22. Voltamperograma cíclico de la reducción de 1 mmol L^{-1} de Cu(II) en 0.1 mol L^{-1} de KCl a como electrolito soporte desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}), utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo y a una velocidad de barrido de 0.100 V s^{-1} (discontinuo en rojo) y ajuste al voltamperograma experimental (continuo en negro).

Al igual que con el medio amortiguado se realizó un estudio por cronoamperometría para determinar el coeficiente de difusión de la especie que se reduce y confirmar una vez más que no existe adsorción sobre el electrodo de trabajo en las condiciones en las que se trazaron los voltamperogramas de la figura 4.20. En la figura 4.23 a) se muestra el cronoamperograma ($i = f(t)$) de doble impulso. Con un primer pulso de potencial de -0.200 V y el segundo de 0.500 V durante 5 segundos cada uno. En la figura 4.23 b) se muestra el análisis de resultados para primer pulso de potencial de acuerdo con la ecuación de Cottrell (2.14) $i = f(t^{-1/2})$, misma que se ajusta a una línea recta de ecuación $i = -2.72 \times 10^{-5}t^{1/2} - 5.29 \times 10^{-6}$ ($r^2 = 0.9977$). A partir de la pendiente de esta recta se obtuvo el coeficiente de difusión de la especie oxidante el cual tiene un valor promedio para tres experimentos independientes de $D_{ox} = 13.42 \times 10^{-6} \pm 0.03 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

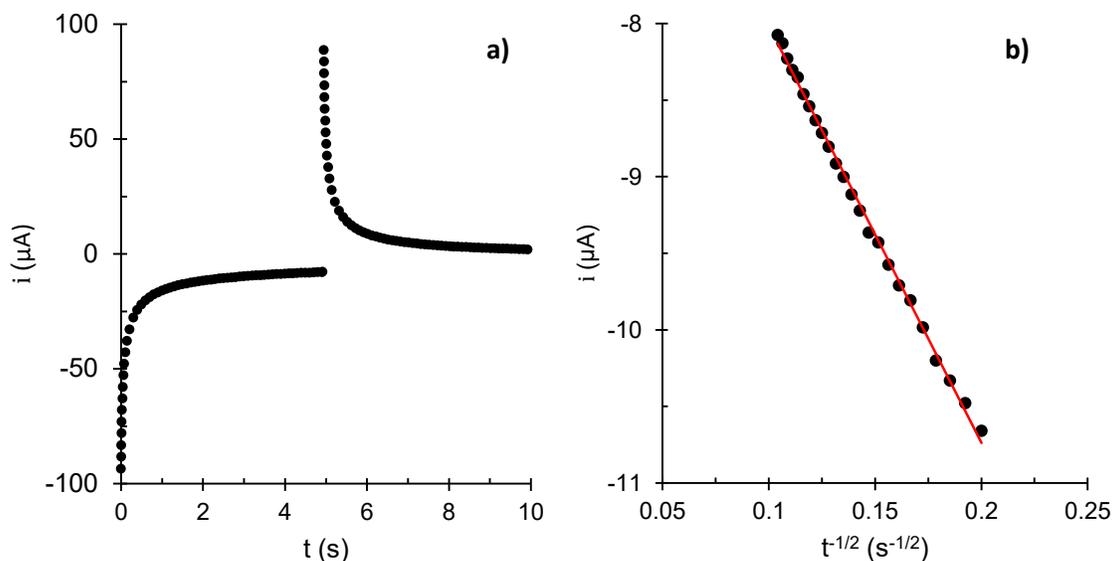
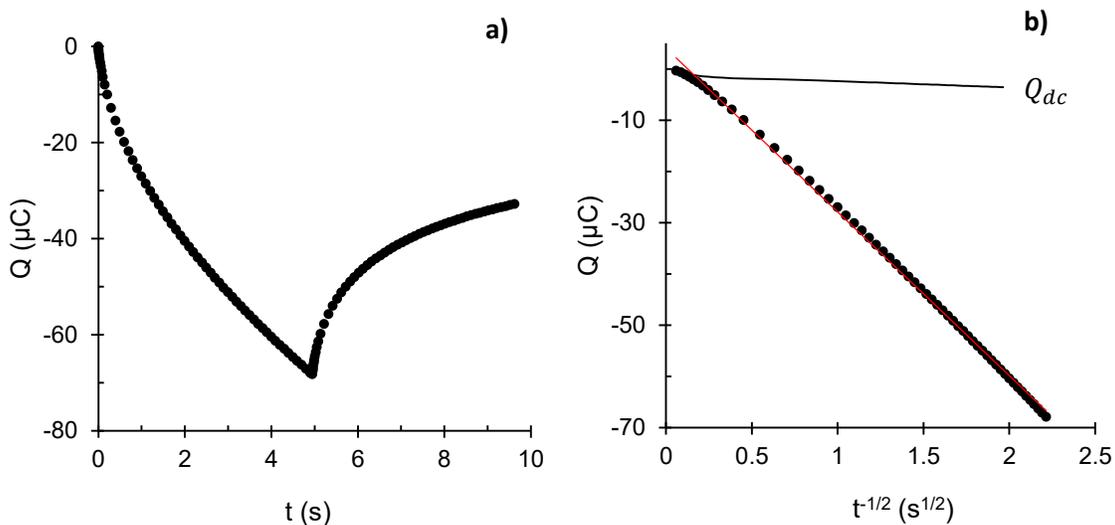


Figura 4.23. a) Cronoamperograma de doble pulso de potencial de 1 mmol L⁻¹ de Cu(II) en 0.1 mol L⁻¹ de KCl como electrolito soporte y b) grafica de $i = f(t^{-1/2})$ (círculos negros) y el ajuste lineal (línea continua roja) para el primer pulso de potencial.



4.24. a) Carga como función del tiempo construida del cronoamperograma de la figura 4.23 a) y b) carga como función de la raíz cuadrada del tiempo para el primer pulso de potencial de la cronoamperometría de la figura 4.23 a) (círculos negros), el ajuste lineal (línea continua roja) y la carga de la doble capa eléctrica de 0.1 mol L⁻¹ KCl (línea continua negra).

Una vez obtenido el coeficiente de difusión se construyó la gráfica de carga como función del tiempo, $Q = f(t)$, a partir del cronoamperograma, que se muestra en la figura 4.24 a) para los dos pulsos enviados. La gráfica de $Q = f(t^{1/2})$ mostrada en la figura 4.24 b) para el primer pulso de potencial presenta un comportamiento lineal

descrito por la ecuación $Q = -31.97t^{1/2} + 4.04$ ($r^2 = 0.9986$) para la disolución 1 mmol L⁻¹ de Cu(II). Mientras que para el electrolito soporte mantiene una carga aproximadamente constante (estimada de un experimento de cronoamperometría en ausencia de Cu(II) la cual intersecta con el valor para la disolución de Cu(II) demostrando así que no existe una carga adicional por adsorción en estas condiciones.

Dado que se pudieron obtener diversos parámetros electroquímicos de la reacción de $\text{Cu(II)} + 1e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ en ambos medios acuosos, resulta interesante comparar estos parámetros con los que se obtienen del ferricianuro de potasio, un estándar electroquímico monoelectrónico en disolución acuosa. Los resultados también fueron obtenidos en ambos medios acuosos a la misma concentración y condiciones. Los resultados son presentados en la tabla 4.2 donde se comparan los parámetros electroquímicos de ambas especies electroactivas en ambos medios acuosos. En el caso del Cu(II) se nota claramente que la especie en agua y en el medio amortiguado no es la misma puesto que los potenciales de media onda son muy distintos. Se necesita aplicar más energía para reducir el Cu(II) a Cu(I) en la disolución de Tris-HCl. Los coeficientes de difusión se mantienen en el mismo orden de magnitud y con valores esperados para medios acuosos^[116], pero en general son menores en el medio amortiguado, algo que es de esperarse porque tanto la viscosidad del medio como la especie de Cu(II)-Tris es más voluminosa que una especie de cobre coordinada con moléculas de agua. Para el caso de la k^0 el valor de ésta es mayor también en la disolución de KCl indicando que en este medio es más rápida la transferencia de los electrones, algo que también está de acuerdo con los valores de α en cada disolvente. En el ferrocianuro se puede ver que el potencial de media onda en ambos medios es muy similar, como se espera, puesto que es un estándar electroquímico en disolución acuosa y una característica necesaria que debe cumplir es que su energía de solvatación debe ser muy similar en todos los disolventes de índole acuosa. En los coeficientes de difusión y la constante de velocidad se observa algo similar que con el Cu(II). Los coeficientes de difusión tiene un valor mayor en el medio amortiguado, lo que puede estar relacionado con el cambio en viscosidad de los medios y la constante tiene valores mayores en la

disolución de KCl. Por último los valores de α también son similares en ambos medios. Ahora bien si se comparan los parámetros generales de la voltamperometría cíclica obtenidos entre las diferentes especies electroactivas se puede observar que presentan valores de orden de magnitud similar, lo que indica que en estas condiciones el Cu(II) tiene un comportamiento similar al de un estándar.

Tabla 4.2. Parámetros electroquímicos obtenidos para el Cu(II) y el ferricianuro de potasio en KCl y en el medio que simula condiciones fisiológicas.

Especie	$E_{1/2}$ (V)	$D_{ox} \times 10^{-6}$ ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)	$D_{red} \times 10^{-6}$ ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)	$k^0 \times 10^{-3}$ (cm s^{-1})	α
0.1 mol L ⁻¹ de KCl					
Cu(II)	0.112 ± 0.001 ^a	7.47 ± 0.02 ^a	7.20 ± 0.01 ^a	7.62 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.03 ^b
	0.132 ± 0.002 ^b	15.20 ± 0.40 ^b	14.87 ± 0.48 ^b	5.01 ± 0.42 ^b	
		13.42 ± 0.03 ^c			
Ferricianuro	0.351 ± 0.002 ^a	2.35 ± 0.06 ^a	2.91 ± 0.09 ^a	5.84 ± 0.03 ^a	0.49 ± 0.01 ^b
	0.362 ± 0.004 ^b	3.08 ± 0.04 ^b	3.06 ± 0.02 ^b	4.37 ± 0.04 ^b	
		11.20 ± 0.63 ^c			
0.1 mol L ⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L ⁻¹ de KCl y pH = 7.4					
Cu(II)-Tris	-0.066 ± 0.001 ^a	2.98 ± 0.35 ^a	2.24 ± 0.23 ^a	3.11 ± 0.51 ^a	0.35 ± 0.08 ^b
	-0.035 ± 0.007 ^b	11.05 ± 0.66 ^b	1.59 ± 0.18 ^b	2.37 ± 0.45 ^b	
		12.99 ± 0.09 ^c			
Ferricianuro	0.380 ± 0.003 ^a	4.75 ± 0.08 ^a	3.96 ± 0.09 ^a	2.75 ± 0.06 ^a	0.45 ± 0.01 ^b
	0.372 ± 0.007 ^b	5.01 ± 0.02 ^b	5.03 ± 0.02 ^b	1.96 ± 0.01 ^b	
		11.70 ± 0.09 ^c			

^a: Voltamperometría cíclica, ^b: Ajuste y ^c: Cronoamperometría

Hasta este punto se ha caracterizado el cobre en distintos medios acuosos mediante técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica, que es de la cual se puede extraer más información. Tiene una sensibilidad para detectar (con dificultad) el Cu(II) en el medio amortiguado a pH = 7.4 de aproximadamente 280 $\mu\text{mol L}^{-1}$ lo cual podría parecer un buen valor, pero para realizar experimentos con proteínas esto puede significar mucha proteína, además de que las señales en voltamperometría cíclica a concentraciones bajas no se definen correctamente. La técnica de voltamperometría diferencial de pulsos permite analizar de manera sencilla muestras a una concentración por debajo de 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por lo que es una técnica idónea para estudiar proteínas que son difíciles de obtener o/y costosas. Por esta razón se realizó un estudio de voltamperometría diferencial de pulsos cíclica para el Cu(II) en el medio a pH = 7.4. Los resultados se muestran en la gráfica de la figura 4.25, en a) se muestran los voltamperogramas como función de la

concentración de Cu(II). Los voltamperogramas se trazaron de manera cíclica para regresar lo transformado a Cu(I) a su estado original de Cu(II). En b) se muestra la Δi de pico como función de la concentración de Cu(II), únicamente para la reducción, en la cual se puede observar que la gráfica tiene el comportamiento lineal descrito por la ecuación $-\Delta i = 2.88 \times 10^{-3} C_{\text{Cu(II)}} + 0.09$ ($r^2 = 0.9945$). En esta gráfica se muestra una concentración mínima de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, siete veces menos que lo mínimo que se pudo detectar por voltamperometría cíclica, aunque en otros experimentos se logró disminuir la concentración de Cu(II) hasta $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

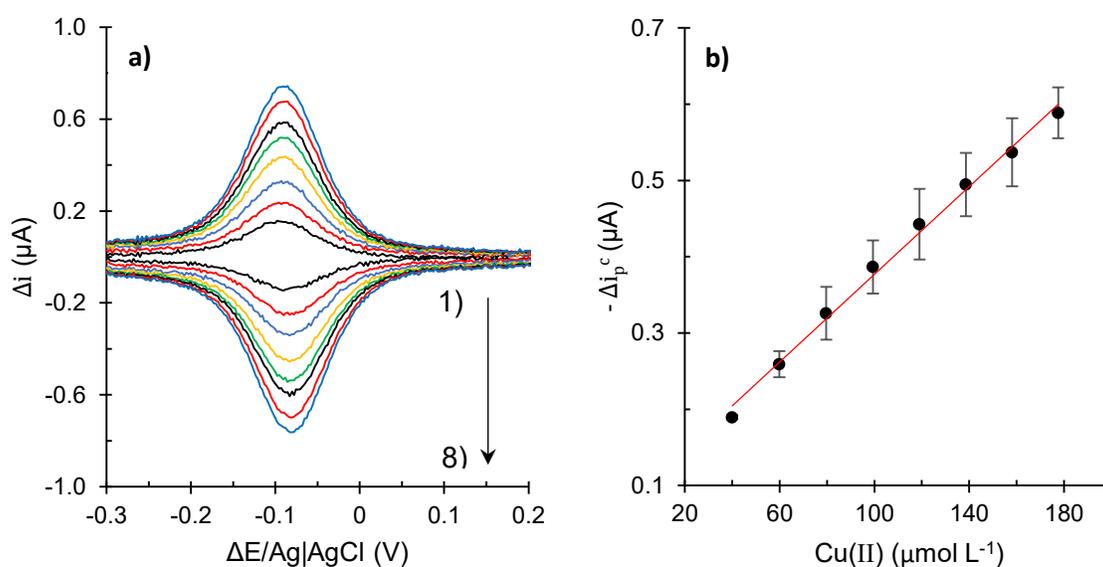


Figura 4.25. a) Voltamperogramas como función de la concentración de Cu(II) 1) 40.00, 2) 59.88, 3) 79.68, 4) 99.40, 5) 119.05, 7) 138.61, 7) 158.10 y 8) 177.51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y b) $-\Delta i_p^c = f(\text{Cu(II)})$ (círculos negros) y el ajuste lineal (línea continua roja) en el medio amortiguado de 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl a $\text{pH} = 7.4$.

La relación de corriente entre la señal de reducción y oxidación para todos los experimentos mostrados en la figura anterior es $\frac{\Delta i_p^c}{\Delta i_p^a} = 0.98 \pm 0.03$, lo que indica que la reacción electroquímica $\text{Cu(II)} + e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ en estas condiciones es reversible. El potencial de media onda obtenido mediante esta técnica de acuerdo con la ecuación 2.44 es $E_{1/2} = -0.062 \pm 0.003 \text{ V}$ el cual coincide favorablemente con lo observado en la tabla 4.2.

Una vez estudiado el Cu(II) se realizó un estudio similar para la Casiopeína III-ia, para entender su comportamiento electroquímico en un medio acuoso que simula las condiciones fisiológicas. En la figura 4.26 se muestran los perfiles voltamperométricos de los dos ligantes de la Casiopeína III-ia, a una concentración de 1 mmol L^{-1} , realizados en direcciones de potencial negativo y positivo y a una velocidad de 0.05 V s^{-1} . Se observa que ambas especies muestran electroactividad.

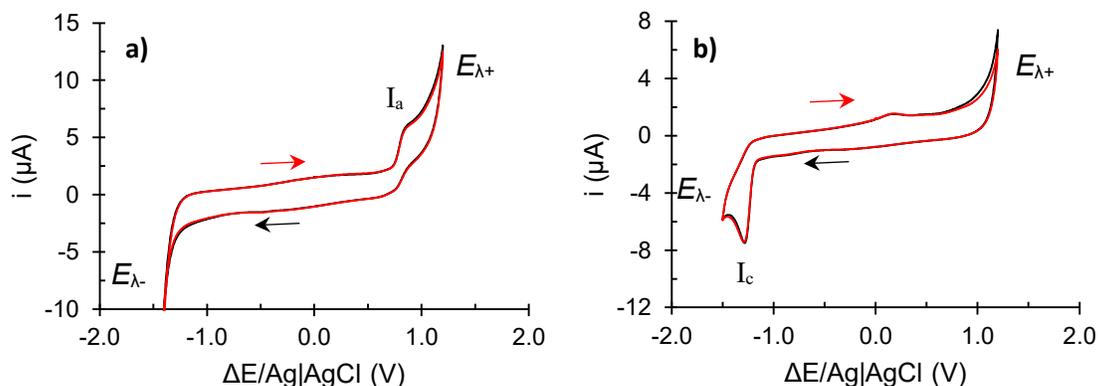


Figura 4.26. Voltamperogramas cíclicos de los ligantes que tiene la Casiopeína III-ia. a) 1 mmol L^{-1} de acetilcetona disuelta en la disolución amortiguadora 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$. b) 1 mmol L^{-1} de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina disuelta en la mezcla medio amortiguado/etanol 90:10. Los voltamperogramas se trazaron a una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} . En negro es el voltamperograma trazado en dirección de potenciales negativos y en rojo en dirección de potenciales positivos, desde el potencial de circuito abierto ($E_{pca} = 0.1 \text{ V}$).

En el voltamperograma de la acetilcetona mostrado en la figura 4.26 a), se observa un proceso de oxidación irreversible I_a con una posición de pico de $E_p^a = 0.859 \text{ V/Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, sin importar en qué sentido se realice el barrido de potencial. La figura 4.26 b) corresponde a la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina la cual presenta un proceso de reducción I_c , igualmente irreversible, con un valor de potencial de pico $E_p^c = -1.254 \text{ V/Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$ a 0.05 V s^{-1} cercano a la barrera catódica. Puesto que el objetivo de este trabajo no es el de caracterizar los procesos electroquímicos que sufren los ligantes de la Casiopeína en estudio, se deja solo esta descripción de los perfiles y señales electroquímicas que presentan para tener una idea más clara de las señales que se observan cuando se trabaja con la Casiopeína III-ia como tal.

En la figuras 4.27 se muestran los voltamperogramas cíclicos trazados tanto en dirección de potenciales negativos como positivos en todo el intervalo del dominio de electroactividad para de la Casiopeína III-ia.

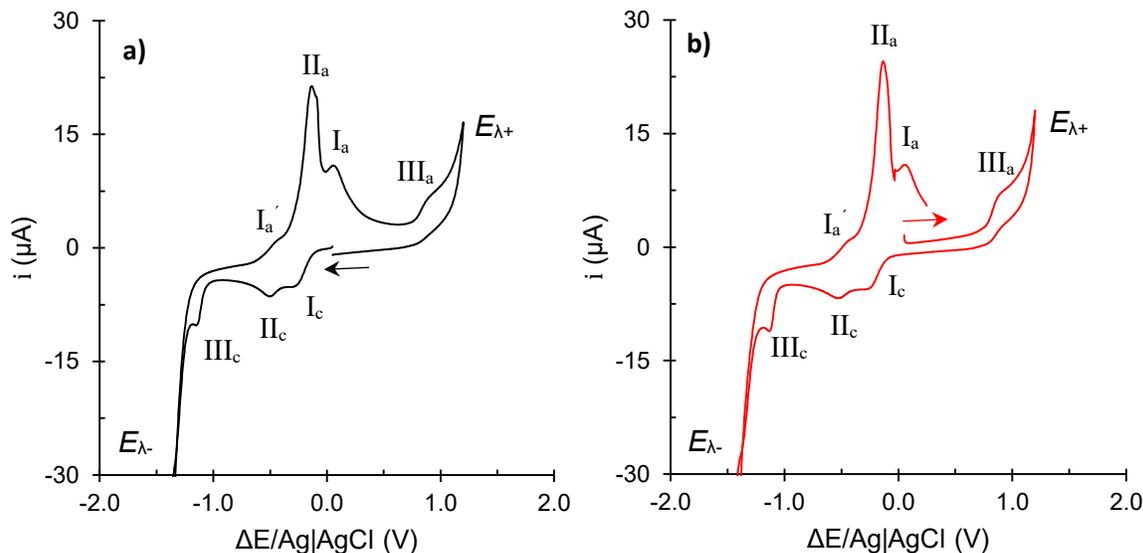


Figura 4.27. Perfil voltamperométrico de la Casiopeína III-ia a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. Los voltamperogramas se trazaron a una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} y empleando carbón vítreo como electrodo de trabajo. a) Voltamperograma trazado en dirección de potenciales negativos y b) en dirección de potenciales positivos. Ambos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}).

Se pueden observar tres señales de reducción I_c , II_c y III_c con una posición de potencial de -0.247 , -0.502 y $-1.135 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$ respectivamente, si el barrido de potencial se realiza en dirección negativa y cuando el barrido es en sentido positivo $E_p^c = -0.222 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, $E_p^c = -0.501 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$ y $E_p^c = -1.097 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$. Por otro lado las tres señales de oxidación I_a , I_a' , II_a y III_a con posiciones -0.075 , -0.459 , -0.137 y $0.885 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$ respectivamente y cuando el barrido se hace en sentido negativo, mientras que al realizar el barrido hacia potenciales positivos las posiciones de potencial son -0.073 , -0.461 , -0.137 y $0.874 \text{ V/ Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$. Se observa entonces que las mismas señales están presentes en ambas direcciones de barrido de potencial. La señal I_a presenta el perfil de una redisolución o desadsorción de una especie generada sobre el electrodo de trabajo y que está relacionada con un proceso electroquímico del núcleo metálico de Cu(II) . Puesto

que las señales de los ligantes se observan con el mismo perfil aun cuando ya están unidos al metal y estos se pueden ver en los procesos electroquímicos etiquetados como III_c y III_a de la figura anterior, los procesos electroquímicos de la figura 4.27 etiquetados como I_c, II_c, I_a, I_a' y II_a deben entonces estar relacionados con el centro metálico de la Casiopeína III-ia.

En la figura 4.28 se muestra el voltamperograma cíclico para esta Casiopeína trazado únicamente en dirección negativa, puesto que el compuesto tiene un centro metálico en un estado de oxidación donde este no puede oxidarse más, además de que ya se comprobó en la figura 4.27 que el realizar el barrido en dirección positiva o negativa para el intervalo de -1.00 a 0.65 V se obtiene el mismo resultado. En el voltamperograma se pueden observar dos señales de reducción I_c y II_c a una posición de -0.246 y -0.482 V/ Ag⁺/AgCl_(s), respectivamente. Además de tres señales de oxidación I_a, I_a' y II_a las cuales se encuentran a un valor de potencial de -0.176, -0.454 y -0.089 V/ Ag⁺/AgCl_(s). Se puede observar que estos procesos electroquímicos no corresponden con lo obtenido en los voltamperogramas de la figura 4.27. La señal que representa la redisolución de una especie (II_a) ahora esta desplazada hacia potenciales más positivos, se observa más fina y aparece después del proceso etiquetado en la figura anterior como I_a, a diferencia de lo observado en la figura 4.27 donde la señal que caracteriza una redisolución aparece antes del otro proceso. Esto se puede explicar pensando que al cerrar el intervalo de potencial las reacciones de transferencia de carga que se dan sobre el electrodo de trabajo son menos. No hay reacciones electroquímicas irreversibles de los ligantes de la Casiopeína, las cuales podrían adsorberse al electrodo de trabajo. Ni especies ácidas y básicas formadas en la barrera anódica y catódica respectivamente y como consecuencia los procesos electroquímicos de adsorción y desorción de Cu⁰ se ven modificados con respecto lo observado en la figura 4.27.

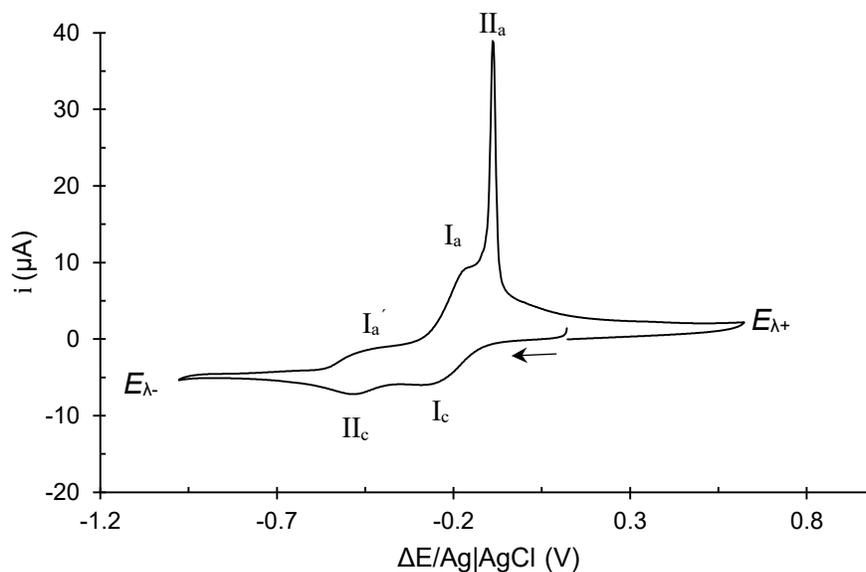


Figura 4.28. Voltamperograma de la Casiopeína III-ia a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. Empleando carbón vítreo como electrodo de trabajo A a una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) y en un intervalo de potencial de -1.00 a 0.65 V .

Para poder asignar y etiquetar de manera correcta que procesos electroquímicos de reducción corresponden con que proceso de oxidación se realizó un experimento modificando el potencial de inversión negativo ($E_{\lambda-}$) desde los -0.350 V y hasta -1.000 V cada 0.050 V , el cual se muestra en a figura 4.29. En ésta se puede observar que la señal que corresponde al proceso de redisolución no corresponde a la segunda señal de reducción, II_c , puesto que la señal de la redisolución comienza a aparecer solo después de usar un $E_{\lambda-} = -0.800 \text{ V}$ y a partir de este valor mientras se disminuye el valor del potencial esta señal aumenta su valor de corriente de pico. Esto se puede explicar de la siguiente manera, primero infiriendo que la señal I_c es atribuida al proceso electroquímico de la reducción del centro metálico de la Casiopeína de $\text{Cu(II)} + 1e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ y la señal II_c se puede explicar porque una vez que el centro metálico de la Casiopeína cambia de estado de oxidación $2+$ a $1+$ la geometría de esta nueva especie ya no es de pirámide de base cuadrada si no que se transforma en un tetraedro perdiendo, muy probablemente, el ligante acetilacetionato y sustituyéndolo con moléculas de Tris de esta manera, $\text{Cu}^{2+}\text{LM} + 1e^- \rightarrow \text{Cu}^{1+}\text{L(Tris)}_2$ (donde L es la bipyridina y M el acetilacetionato, figura 1.2). Una

vez formada esta nueva especie $\text{Cu}^{1+}\text{L}(\text{Tris})_2$ está reacciona con otra similar por dismutación generando una nueva especie de $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Cu}(\text{0})$ de acuerdo con, $\text{Cu}^{1+}\text{L}(\text{Tris})_2 + \text{Cu}^{1+}\text{L}(\text{Tris})_2 \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+}\text{L}(\text{Tris})_2 + \text{Cu}^0$. La especie formada $\text{Cu}^{2+}\text{L}(\text{Tris})_2$ reduce su centro metálico a $\text{Cu}(\text{I})$ generando la señal II_c ($\text{Cu}^{2+}\text{L}(\text{Tris})_2 + 1e^- \rightarrow \text{Cu}^{1+}\text{L}(\text{Tris})_2$) y el $\text{Cu}(\text{0})$ se queda en disolución puesto que el barrido de potencial es lo suficientemente lento para que la reacción de dismutación se lleva a cabo en fase homogénea además, como se observa en la figura 4.30 la señal II_c no genera ningún pico de redisolución, y la señal de I_a' corresponde a la reacción electroquímica inversa de la señal II_c ($\text{Cu}^{1+}\text{L}(\text{Tris})_2 - 1e^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}\text{L}(\text{Tris})_2$).

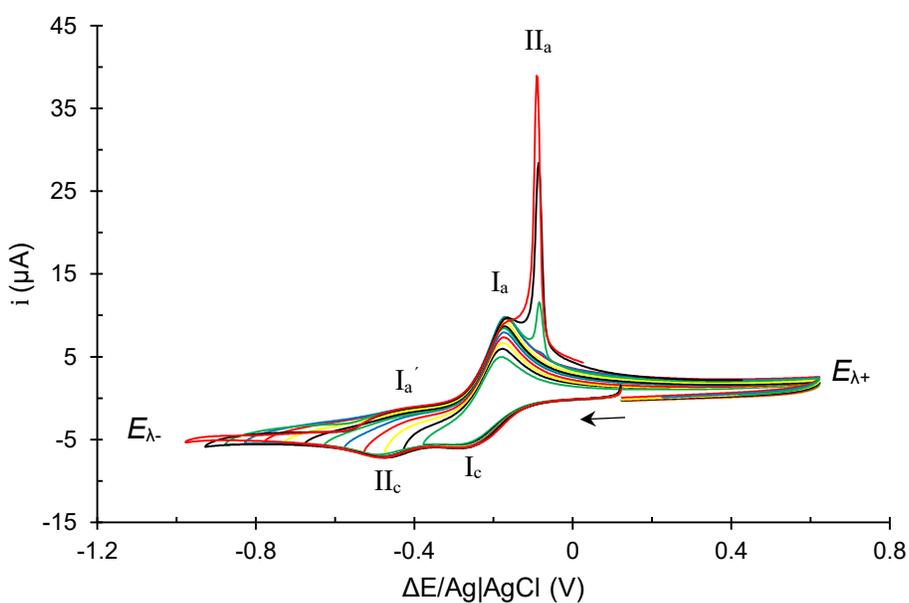


Figura 4.29. Voltamperogramas cíclicos de la Casiopeína III-ia a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. A una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) cambiando el valor del potencial de inversión negativo ($E_{\lambda-}$) de -0.05 en -0.05 V desde -0.350 y hasta -1.000 V .

La reacción electroquímica en el centro metálico de la Casiopeína, $\text{Cu}(\text{I}) + 1e^- \rightarrow \text{Cu}(\text{0})$, no es observable en estas condiciones pero existe porque la reacción inversa sí se observa en la señal II_a (que como ya se mencionó) tiene el perfil de una redisolución, en este caso del $\text{Cu}(\text{0})$ depositado sobre el electrodo de trabajo. Al disminuir el valor del potencial de inversión entonces se da más tiempo a que una mayor cantidad de $\text{Cu}(\text{0})$ sea depositado sobre el electrodo trabajo y si recordamos

que las señales son proporcionales a la concentración, entonces eso explica el aumento en corriente para esta señal.

Como ya se mencionó anteriormente la señal de oxidación II_a solo aparece cuando se utiliza un $E_{\lambda^-} = -0.800$ V o menor, por lo que se decidió realizar un experimento limitando el intervalo de barrido de potencial entre -0.650 y 0.350 V y realizando 10 ciclos seguidos para observar si el proceso de adsorción sobre el electrodo de trabajo afecta a los otros procesos. Además de que como ya se mencionó con el Cu(II) para los estudios con ASH solo son de interés los procesos en disolución. El resultado se muestra en la figura 4.30, donde se puede ver que los diez voltamperogramas se sobreponen uno sobre otro. Lo que significa que a estas condiciones no existen procesos de adsorción puesto que no hay modificaciones en la corriente o de posiciones de los picos.

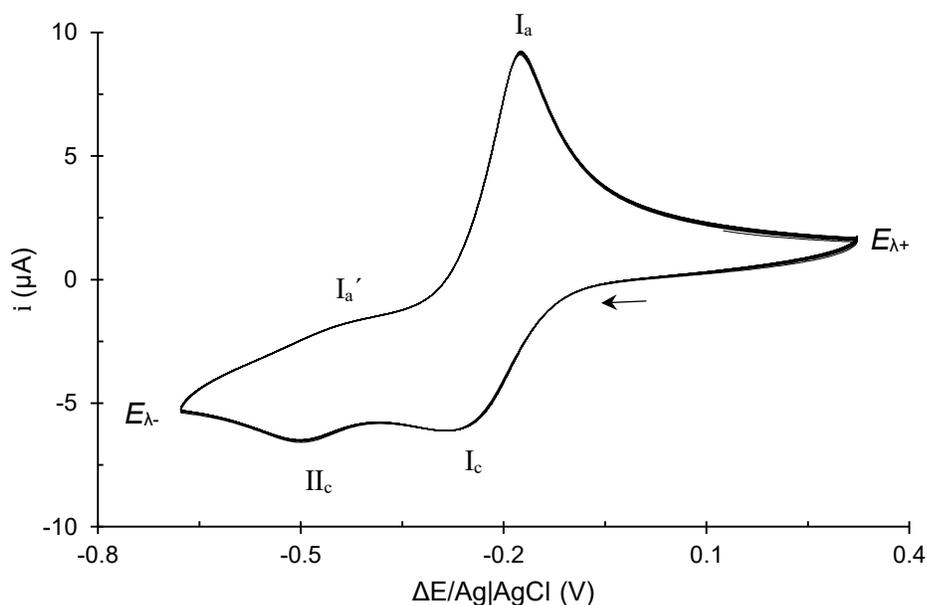


Figura 4.30. Perfil voltamperométrico de 10 ciclos seguidos de la Casiopeína III-ia a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. Utilizando un electrodo de trabajo de carbón vítreo y a una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) y en un intervalo de potencial de -0.650 a 0.350 V.

Para seguir estudiando estos tres procesos electroquímicos se realizó un experimento modificando la velocidad de barrido de potencial en un intervalo de

potencial similar al de la figura 4.30. En la figura 4.31 a) se muestran los perfiles de los voltamperogramas resultado de modificar la velocidad de barrido (0.05 a 1.00 V s^{-1}) en el intervalo de potencial donde se observan los procesos electroquímicos I_c , II_c , I_a' y I_a y en 4.31 b) las gráficas de $i_p = f(v^{1/2})$ para los procesos I_c , II_c , y I_a . En este intervalo de barrido de potencial (-0.700 y 0.600 V) y de velocidades de barrido de 0.05 y 1.00 V s^{-1} el proceso electroquímico I_c no presentan adsorción sobre el electrodo de trabajo, como ya se observó en el experimento anterior. Adicionalmente se construyeron las gráficas de $i_p = f(v)$ para comprobar si existe o no adsorción de especies sobre el electrodo de trabajo. Para las gráficas de $i_p = f(v)$ los coeficientes de correlación lineal que se obtuvieron son: 0.951, 0.937 y 0.892 respectivamente mientras que para las gráficas de $i_p = f(v^{1/2})$ son: 0.999, 0.992 y 0.997 para los procesos I_c , II_c y I_a como se puede ver en la figura 4.31. Por lo que se comprueba que el sistema está mejor descrito para cuando no existe adsorción sobre la superficie del electrodo de trabajo.

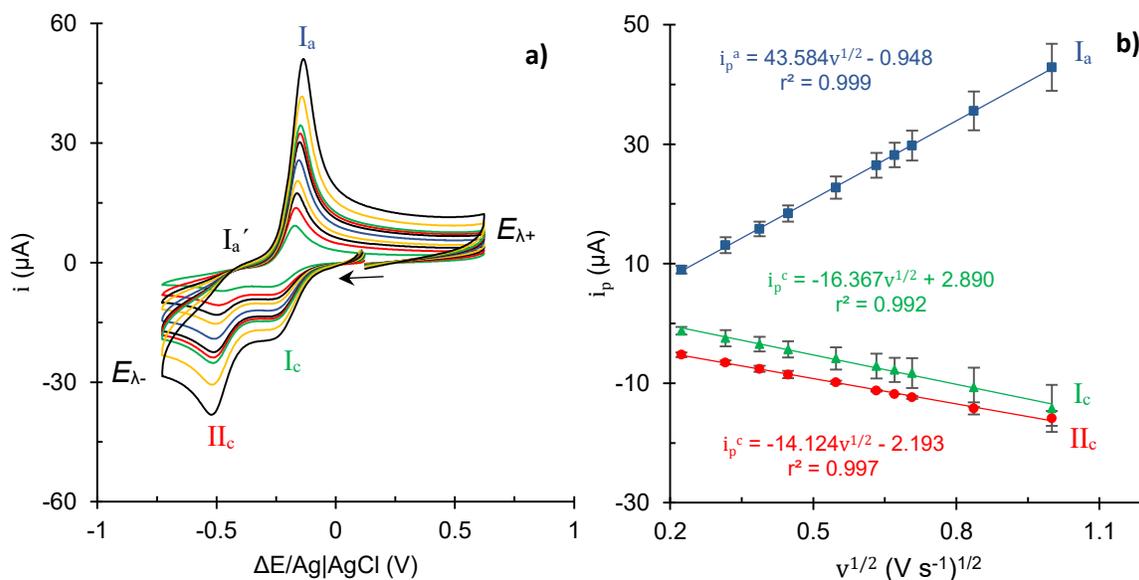


Figura 4.31. a) Voltamperogramas cíclicos en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}) de la Casiopeína III-ia a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte, utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo y variando la velocidad de barrido de 0.05 a 1.00 V s^{-1} . b) Gráficos de $i_p = f(v^{1/2})$ para los procesos electroquímicos I_c , II_c y I_a .

Se puede observar en la figura 4.31 que los procesos electroquímicos I_c y I_a no son sencillos y la relación de corrientes para $i_p^c/i_p^a = 0.47 \pm 0.05$ por el hecho del cambio de estructura y la reacción química acoplada que se da cuando el centro metálico de la Casiopeína es reducido de Cu(II) a Cu(I) y que se observan en las señales I_c y I_a' . Esto limita y complica el análisis de los resultados, por lo que solo se presentará el potencial de media onda de la reacción donde el centro metálico de cobre sufre la siguiente reacción $\text{Cu(II)} + 1e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ $E_{1/2} = -0.207 \pm 0.005$ V.

También se realizó un experimento de voltamperometría diferencial de pulsos a las mismas condiciones que con el Cu(II) disuelto en el medio amortiguado de Tris-HCl, para conocer una concentración de Casiopeína del orden de $\mu\text{mol L}^{-1}$ que sea posible monitorear mediante el uso de una técnica electroquímica para el momento en que esta sea mezclada con la albúmina. Los resultados se muestran en la figura 4.32, en a) se muestran los voltamperogramas que se trazaron de manera cíclica para regresar el centro metálico transformado a Cu(I) a su estado original de Cu(II). Mientras que en b) se muestra la Δi de pico como función de la concentración de Casiopeína III-ia, únicamente para la reducción, en la cual se puede observar que la gráfica tiene un comportamiento lineal descrito por la ecuación $-\Delta i = 3.25 \times 10^{-3} C_{\text{Casiopeína III-ia}} + 0.14$ ($r^2 = 0.9901$). En esta gráfica de la corriente de pico se muestra una concentración mínima de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, aunque también se logró observar hasta $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Se puede observar que la pendiente de la ecuación que describe la gráfica 4.32 b) es mayor que la presenta la misma gráfica pero para el Cu(II), figura 4.25 b), por lo que en estas condiciones la técnica es más sensible para la Casiopeína que para el Cu(II). En el caso de la Casiopeína la reversibilidad del sistema es menor que para el Cu(II), puesto que la relación de corrientes para este sistema es de apenas 0.79 ± 0.07 . Algo que ya se había observado desde los experimentos de voltamperometría cíclica. Por lo que solo se mencionará la posición promedio de los picos en voltamperometría diferencial de pulsos, el cual tiene un valor de $E_p = -0.187 \pm 0.007$ que se encuentra cercano con el $E_{1/2}$ calculado mediante voltamperometría cíclica.

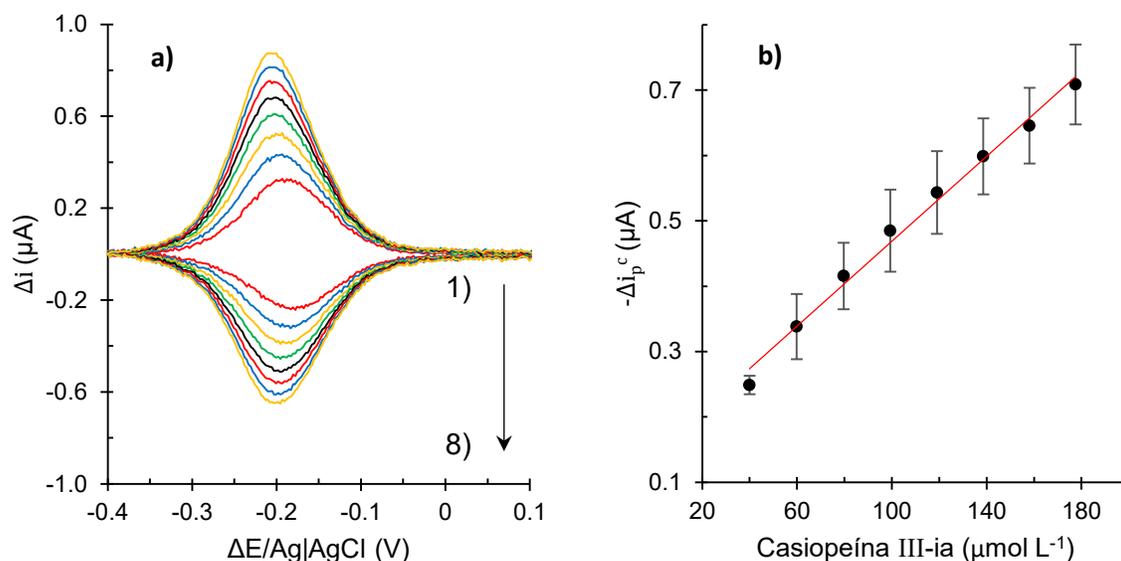


Figura 4.32. a) Voltamperogramas como función de la concentración de Casiopeína III-ia 1) 40.00, 2) 59.88, 3) 79.68, 4) 99.40, 5) 119.05, 6) 138.61, 7) 158.10 y 8) 177.51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y b) $-\Delta i_p^c = f(\text{Casiopeína III-ia})$ (círculos negros) y el ajuste lineal (línea continua roja) en el medio amortiguado de 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl a pH = 7.4 y utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Puesto que se desea trabajar con la proteína albúmina sérica humana en mezclas con Cu(II) y Casiopeína III-ia es importante comprobar si esta presenta o no electroactividad en las condiciones de trabajo (electrodos, disolvente, concentraciones e intervalo de potencial). Por lo que se trazaron los voltamperogramas diferencial de pulsos cíclicos en todo el intervalo del dominio de electroactividad a 0, 20, 50 y 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de la ASH y como se puede ver en la figura 4.33 no existe diferencia entre estos voltamperogramas y el del medio amortiguador. Por lo que a estas condiciones de trabajo esta proteína no presenta electroactividad sobre electrodos sólidos, como ya se ha demostrado en la literatura^[130 - 140]. Lo que sugiere que al hacer las mezclas Cu(II)/ASH y Casiopeína/ASH no existirán señales que puedan interferir y complicar el estudio.

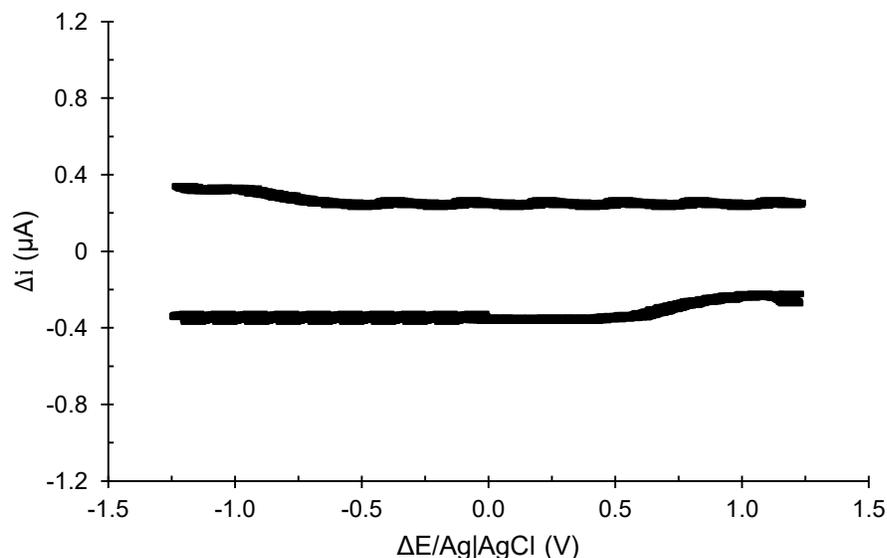


Figura 4.33. Voltamperogramas diferencial de pulsos cíclicos de 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y de 20, 50 y 100 μmol L⁻¹ de ASH disuelta en el mismo medio amortiguado, utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo. Todos los voltamperogramas se empalman generando una línea gruesa que no muestra diferencia apreciable entre cada uno.

En la literatura se ha reportado que la proteína ASH es susceptible a ser inmovilizada sobre la superficie del carbón vítreo (CV) del electrodo de trabajo mediante adsorción, desde una disolución de la proteína. Lo que provee una herramienta electroquímica muy útil para estudiar el modo de interacción entre la macromolécula biológica y, en este caso, el Cu(II) y la Casiopeína III-ia. Logrando distinguir entre atracciones hidrofóbicas y no hidrofóbicas^[117 -120]. Por lo que para poder hacer esta determinación se tiene que hacer la preparación de un nuevo electrodo de trabajo de carbón vítreo modificado con la proteína de suero humano (CV-ASH) siguiendo un procedimiento similar al reportado en la literatura y que consiste en colocar una gota de 10 μL de una disolución 60 μmol L⁻¹ de la proteína sobre la superficie del carbón vítreo la cual se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente ser enjuagado con el amortiguador 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4, para remover la proteína no adsorbida^[117 - 120], como se muestra en la figura 4.34.

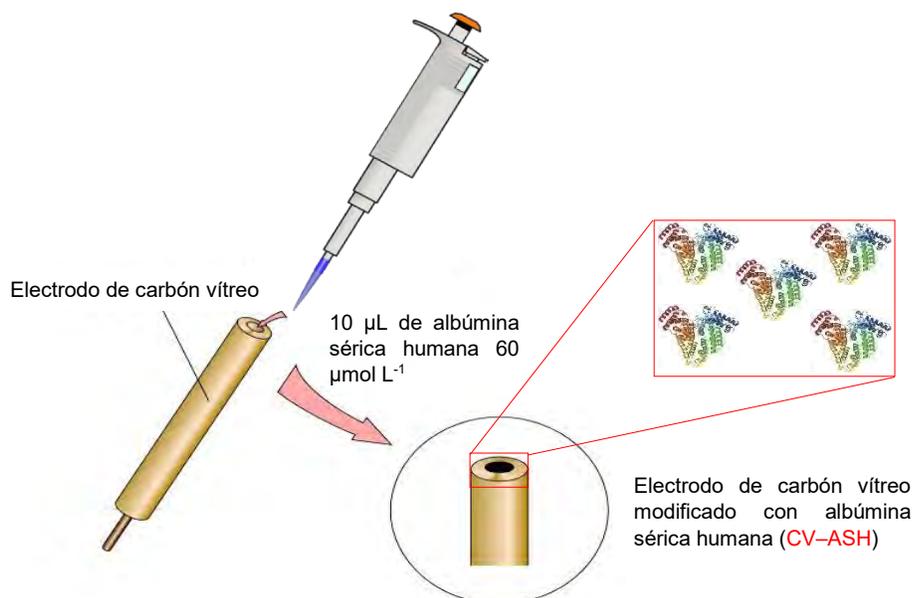


Figura 4.34. Preparación del electrodo de carbono vítreo modificado con albúmina sérica humana (electrodo de trabajo CV-ASH).

Este método fue utilizado primero para el estudio de la interacción entre ADN y compuestos de coordinación con centro metálico de Fe(II) y Co(III)^[117, 118], para después ser extendido a proteínas como la ASH en interacción con cationes metálicos y compuestos orgánicos^[119, 120]. Esta técnica tiene la gran ventaja, además de la información que brinda, de que se usa una pequeña cantidad de proteína en comparación con otras técnicas. En la figura 4.35 se muestra el voltamperograma cíclico de 1 mmol L⁻¹ de Cu(II) disuelto en el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 como electrolito soporte, usando los electrodos de trabajo CV y CV-ASH a una velocidad de 0.05 V s⁻¹. Usando el electrodo de CV se pueden observar los dos procesos de reducción I_c y II_c a potenciales de media onda de -0.068 y -0.468 V/Ag⁺/AgCl_(s) que corresponden a los procesos electroquímicos de la reducción de Cu(II) + 1 e⁻ → Cu(I) y de Cu(I) + 1 e⁻ → Cu(0) respectivamente. Cuando se usa el electrodo CV-ASH los potenciales de media onda para las señales I_c y II_c (solo se analizarán estos dos procesos puesto que la especie de Cu(II) es la que se encuentra en disolución y la especie Cu(I) que se genera al electrodo inmediatamente después) se mueven hacia potenciales más negativos. Este cambio de potencial está relacionado con la

presencia de la proteína sobre el electrodo de trabajo y con la interacción del Cu(II) y Cu(I) con la ASH y que la afinidad de estos iones por las proteína es del mismo tipo. El cambio en el potencial de media onda usando el electrodo de CV con respecto al de CV-ASH para el par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ fue de 33.87 ± 2.82 mV hacia potenciales más negativos y para el par Cu^+/Cu^0 fue de 25.47 ± 2.65 V. El que los potenciales se muevan hacia valores más negativos significa que los iones de cobre en sus estados de oxidación interactúan con la ASH vía fuerzas no hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y/o covalentes/coordinación^[117 - 119]. Resultado que concuerda con lo mencionado en la sección de antecedentes donde se describe que el Cu(II) forma enlaces de coordinación con ciertos residuos de aminoácidos de la ASH.

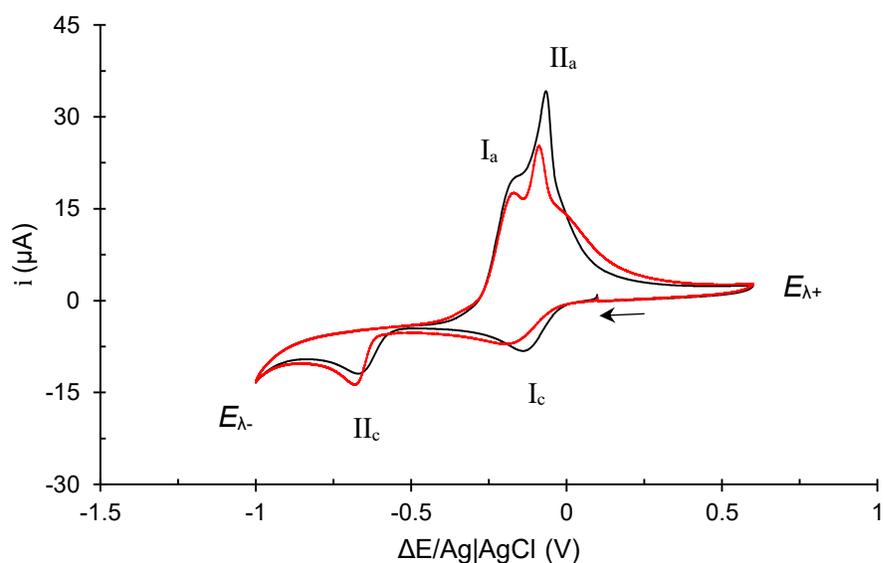


Figura 4.35. Voltamperogramas cíclicos del Cu(II) a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. A una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}). En negro usando el electrodo de carbón vítreo (CV) y en rojo usando el electrodo modificado con la proteína (CV-ASH).

Estos resultados también concuerdan con lo reportando en la literatura utilizando como sal de cobre el CuCl_2 y en un medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de fosfatos, 0.1 mol L^{-1} de KCl 1 a $\text{pH} = 7.4$ ^[119]. Lo que significa que el tipo de interacción es independiente del cambio de medio acuoso. Cabe destacar que debido a que el ion

Cu^+ es inestable en disoluciones acuosas, por lo que sólo pueden usarse mediciones electroquímicas a través de un electrodo modificado con albúmina para identificar la interacción Cu^+ -albúmina. El Cu^+ en este experimento se ha generado *in situ* sobre la superficie del electrodo y su unión a la ASH puede ser detectada.

Para el caso de la Casiopeína III-ia se realizó un experimento similar del cual los resultados se muestran en la figura 4.36 donde se observa el voltamperograma cíclico de 1 mmol L^{-1} de la Casiopeína III-ia disuelta en el mismo medio amortiguador a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte, usando los electrodos de trabajo CV y CV-ASH a una velocidad de 0.05 V s^{-1} . Usando el electrodo de CV se pueden observar los dos procesos de reducción I_c y II_c con potenciales de media onda de -0.207 y $-0.425 \text{ V/Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$ que corresponden a los procesos electroquímicos en el centro metálico de Cu(II) de la reducción de $\text{Cu(II)} + 1e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ y a la reducción de especie de Cu(II) sin el ligante acetilacetato de la molécula de la Casiopeína, respectivamente. Cuando se usa el electrodo CV-ASH los potenciales de media onda para las señales I_c y II_c no se mueven hacia el mismo sentido, para la señal I_c se mueve hacia potenciales más positivos, en $9.69 \pm 0.61 \text{ mV}$, lo que significa que a diferencia del Cu(II) la Casiopeína tendría una interacción con la ASH del tipo hidrofóbica/hidrofílica (no específica)^[117 – 120]. Lo que significa que el centro metálico de Cu(II) en la Casiopeína no pierde sus ligantes para formar un nuevo compuesto de coordinación con los residuos de aminoácidos de la proteína y por lo tanto no se une al sitio específico para Cu(II) que tiene la ASH. Por otro lado este resultado concuerda con lo reportado en la literatura donde se demostró que la Casiopeína III-ia presenta actividad superficial, es decir tiene una parte hidrofóbica y otra hidrofílica en su molécula^[121]. Una característica que presentan la mayoría de los medicamentos orgánicos que les permite tener una interacción directa con proteínas, ADN y membranas celulares^[122].

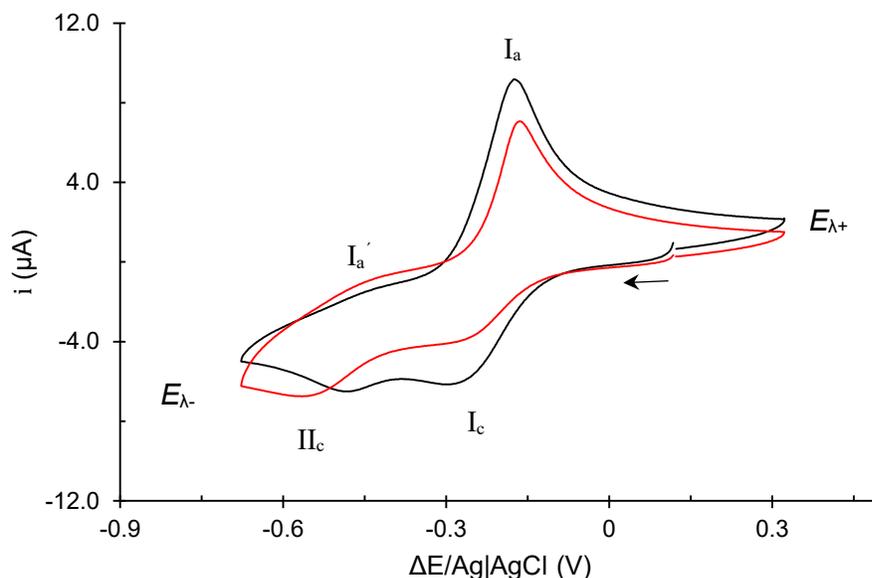
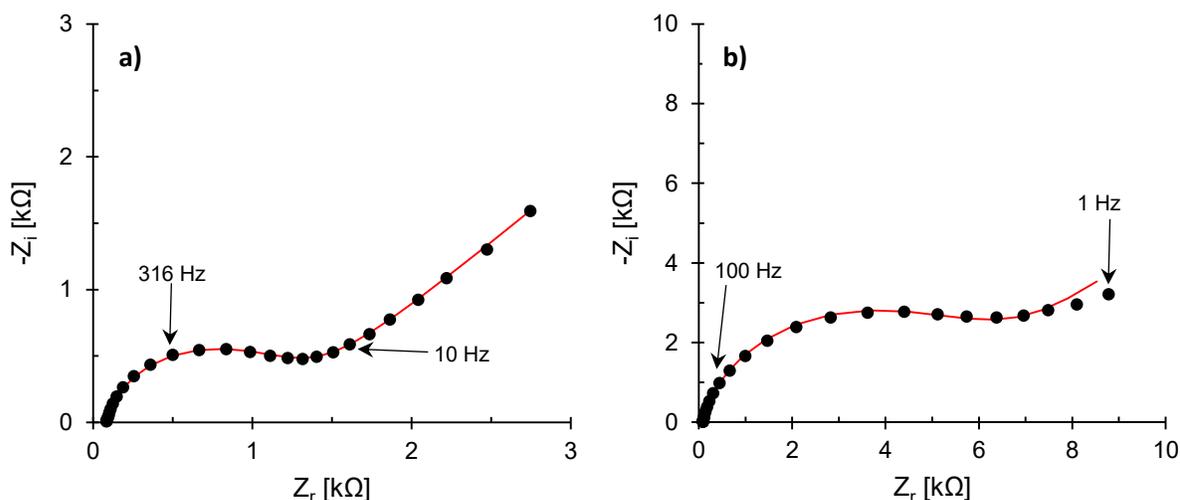


Figura 4.36. Voltamperogramas cíclicos de la Casiopeína III-ia a una concentración de 1 mmol L^{-1} en el amortiguador 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ como electrolito soporte. A una velocidad de barrido de 0.05 V s^{-1} en dirección de potenciales negativos desde el potencial de circuito abierto (E_{pca}). En negro usando el electrodo de carbón vítreo (CV) y en rojo usando el electrodo modificado con la proteína (CV-ASH).

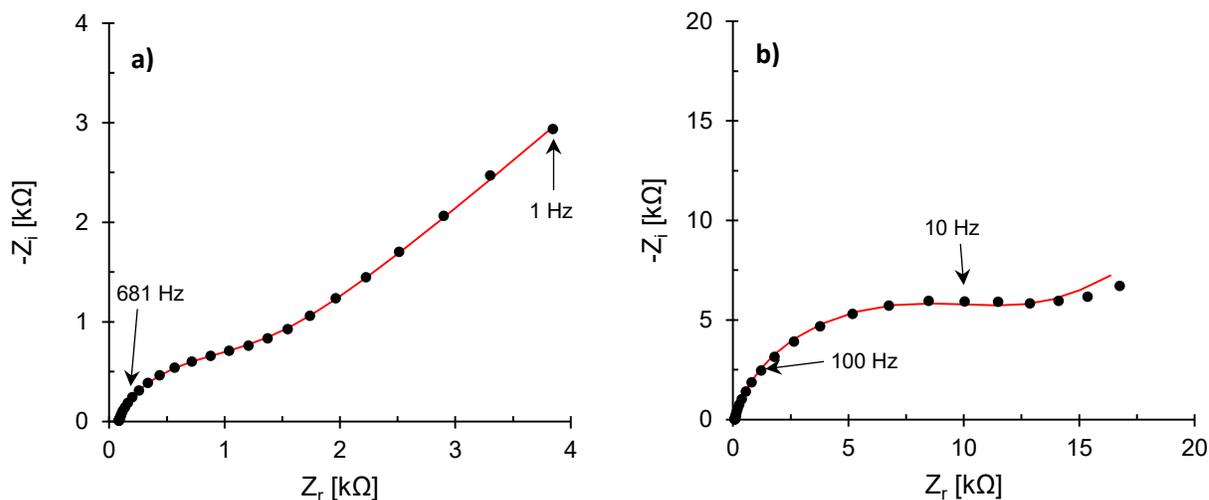
Para la segunda señal II_c el cambio de potencial es hacia potenciales más negativos, $37.63 \pm 1.63 \text{ mV}$, relacionado con la presencia de interacciones de tipo electrostáticas, de coordinación y/o covalentes^[117 - 119]. Cambio que refuerza la hipótesis de que esta señal es de una especie de Cu(II) sin el acetilacetonato de la Casiopeína, como ya se mencionó anteriormente. Porque al perder este ligante ahora es más fácil que esta especie de Cu(II) pueda formar enlaces de coordinación con los residuos de aminoácidos de la proteína.

Para entender cómo se modifican las propiedades de la interfase conductor eléctrico/electrolito en presencia de la proteína adsorbida sobre el conductor eléctrico se realizó un experimento de impedancia electroquímica. En la figura 4.37 y 4.38 se muestran los diagramas de Nyquist que fueron trazados para la disolución de Cu(II) y Casiopeína III-ia, respectivamente. Para los electrodos de CV y el de CV-ASH, los cuales fueron trazados a un potencial igual al $E_{1/2}$ y a una amplitud de 10 mV para cada una de las especies y en cada electrodo. En todos los casos los diagramas pueden ser descritos como un semicírculo a altas frecuencias seguido

por una cola lineal a bajas frecuencias, la cual es atribuida a la difusión semi infinita de las especies electroactivas. Los resultados experimentales fueron ajustados de manera adecuada por un circuito equivalente modificado de Randles como el que se muestra en la figura 4.39.



4.37. Diagramas de Nyquist trazados en el $E_{1/2}$, a una amplitud de 10 mV, de la especie de Cu(II) para un electrodo de a) CV y b) CV-ASH expuestos a una disolución 1 mmol L⁻¹ de Cu(II) en el amortiguador 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 como electrolito soporte. Los puntos y la línea continua representan los datos experimentales y el ajuste, respectivamente.



4.38. Diagramas de Nyquist trazados en el $E_{1/2}$, a una amplitud de 10 mV, de la especie de Casiopeína III-ia para un electrodo de a) CV y b) CV-ASH expuestos a una disolución 1 mmol L⁻¹ de la Casiopeína III-ia en el amortiguador 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 como electrolito soporte. Los puntos y la línea continua representan los datos experimentales y el ajuste, respectivamente.

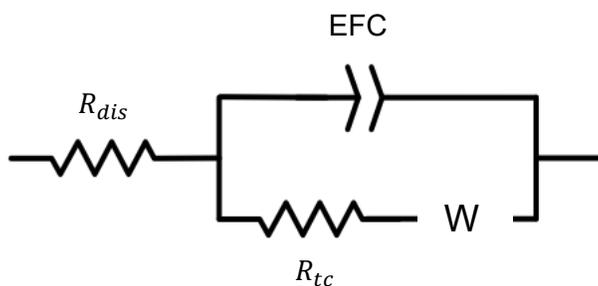


Figura 4.39. Circuito eléctrico equivalente de Randles modificado compatible con los diagramas de Nyquist representados en las figuras 4.37 y 4.38, donde R_{dis} es la resistencia de la disolución, R_{tc} es la resistencia a la transferencia de carga de la reacción electroquímica, EFC es el elemento de fase constante y W es el parámetro de Warburg relacionado con los proceso de difusión.

El circuito tuvo que ser modificado añadiendo el elemento de fase constante en lugar de solo la capacitancia para un modelo de la doble capa eléctrica del electrodo/electrolito. El uso de este EFC se debe a la distribución de los tiempos de relajación como resultado de la superficie heterogénea del electrodo por el efecto de la proteína adsorbida. La impedancia del EFC está definida como:

$$Z_{EFC} = 1/T(j\omega^\alpha) \quad (4.3)$$

donde T es el elemento de la fase constante y es un parámetro de capacidad. α es el exponente del elemento de fase constante y es adimensional el cual está relacionado con el ángulo de fase. El promedio de la capacitancia de la doble capa eléctrica del electrodo es calculado con la siguiente ecuación^[119]:

$$T = C_{dc}(R_{dis}^{-1} + R_{tc}^{-1})^{(1-\alpha)} \quad (4.4)$$

donde R_{dis} es la resistencia de la disolución y R_{tc} es la resistencia a la transferencia de carga y describe qué tan rápido cambia la velocidad de transferencia de carga durante la transición electroquímica con el potencial del electrodo. En la tabla 4.3 se muestran los parámetros obtenidos de los ajustes de los datos experimentales así como el valor de χ^2 (chi-cuadrada) para cada ajuste, el cual es cercano a 0 lo que indica que el ajuste es bueno. Para ambos sistemas debe señalarse que las R_{dis} obtenidas para el electrodo con ASH en comparación con el libre aumentan apenas un par de ohms. Esto indica que la superficie de carbón vítreo está cubierta por un buen conductor. Es importante recordar que la albúmina es estructuralmente

una especie iónica que contiene grupos cargados (por protonación o ionización). Por lo tanto, se puede concluir que las especies iónicas pueden introducirse en la capa de albúmina adsorbida en la superficie del electrodo y lo convierte en un conductor iónico. Por consiguiente, a partir de las medidas de impedancia, se puede deducir que las especies iónicas pueden penetrar en la capa de la ASH (algo que ya se había observado en los experimentos con voltamperometría cíclica). La transferencia de electrones en una película microestructurada es un proceso que involucra la dinámica de varios eventos elementales que se superponen y se influyen mutuamente. Por lo tanto, esta película controla la cinética del transporte de carga asociada con la corriente observada. Dos modelos han sido propuestos para representar las respuestas mostradas por los electrodos modificados en la superficie y se conocen como modelos de membrana y agujeros. El último modelo asume que el recubrimiento de la proteína es impermeable excepto por pequeños orificios a través de los cuales puede difundir las especies electroactivas, mientras que el modelo de membrana presenta el revestimiento como una barrera de fase uniforme con cierta permeabilidad^[119, 123, 124].

En el caso de la R_{tc} esta aumenta considerablemente cuando se tiene el electrodo modificado con la ASH en comparación con el electrodo libre. Esto indica que la velocidad de transferencia heterogénea de electrones a través de la interface electrodo/electrolito se vio obstaculizada por la proteína adsorbida. Si se comparan los resultados de este parámetro para el Cu(II) y la Casiopeína III-ia cuando en ambos sistemas se utiliza el electrodo de carbón vítreo libre se puede ver que son muy similares. Ahora bien, comparando los valores de C_{dc} obtenidos para el electrodo con y sin albúmina sérica humana indicó que la presencia de la ASH disminuyó el valor de la capacitancia de doble capa eléctrica en el electrodo, demostrando que la albúmina influye en la estructura de la doble capa eléctrica. Esto está de acuerdo con los resultados reportados en la literatura para otras interfaces sólido/albúmina^[119]. Este efecto es mucho más significativo para el caso de la Casiopeína III-ia, disminuyendo este parámetro en un tercio de su valor. Mientras que para el caso del Cu(II) únicamente disminuye su valor en aproximadamente 11%. Para el caso del parámetro de Warburg, hay una diferencia

significativa (aproximadamente el doble de valor) entre usar el electrodo de carbón vítreo libre y con ASH adsorbida para ambos sistemas. Siendo más importante el proceso de difusión cuando se usa la albúmina sobre el carbón vítreo para la Casiopeína. Este mismo efecto se observa cuando se comparan los resultados entre el Cu(II) y la Casiopeína III-ia usando el electrodo libre. Por lo que el proceso de difusión para la Casiopeína es más significativo, lo que puede deberse al mayor radio que tiene esta comparada con el Cu(II) en la disolución de Tris-HCl.

Tabla 4.3. Los valores de los elementos en el circuito equivalente representado en la figura 4.39 ajustado en las representaciones de Nyquist de las figuras 4.37 y 4.38.

Sistema	R_{dis} (Ω)	R_{tc} (k Ω)	C_{dc} (μ F)	$W \times 10^3$ (Ω s $^{-1/2}$)	χ^2
Cu(II) CV	84.10 \pm 0.39	1.140 \pm 0.002	1.85 \pm 0.01	3.887 \pm 0.003	0.0071
Cu(II) CV-ASH	86.28 \pm 0.33	5.892 \pm 0.003	1.64 \pm 0.04	7.788 \pm 0.006	0.0093
Casiopeína III-ia CV	82.87 \pm 0.40	1.158 \pm 0.005	6.15 \pm 0.02	7.730 \pm 0.002	0.0079
Casiopeína III-ia CV-ASH	84.69 \pm 0.32	11.923 \pm 0.005	2.11 \pm 0.03	15.097 \pm 0.009	0.0147

En las figuras 4.40 y 4.41 se muestran los voltamperogramas diferencial de pulsos del Cu(II) y la Casiopeína III-ia en ausencia y presencia de la albúmina de suero humano donde para ambos casos se observa una disminución en la corriente de pico. Esta caída de corriente fue monitoreada después de la adición de la ASH (aproximadamente 30 segundos después) y con una agitación constante de 1 y 3 minutos pero no se observó cambio alguno por lo que los voltamperogramas se trazaron después de homogeneizar la disolución durante 1 minuto. En este trabajo y en la literatura se ha demostrado que la ASH no es electroactiva en condiciones fisiológicas y con electrodos de trabajo de estado sólido. También se ha descrito que los aductos formados en disolución fármaco-biomacromolécula son especies no electroactivas, mientras que el fármaco libre sí lo es. La biomacromolécula puede ser ADN o proteínas, mientras que los fármacos son de carácter orgánico o inorgánico (compuestos de coordinación)^[125 – 136]. Por lo que la formación de las especies no electroactivas Cu(II)-ASH y Casiopeína-ASH disminuye la concentración de Cu(II) y Casiopeína III-ia libres en disolución y por lo tanto

disminuye la corriente de pico. Lo que indica la interacción entre los compuestos de cobre y la albúmina.

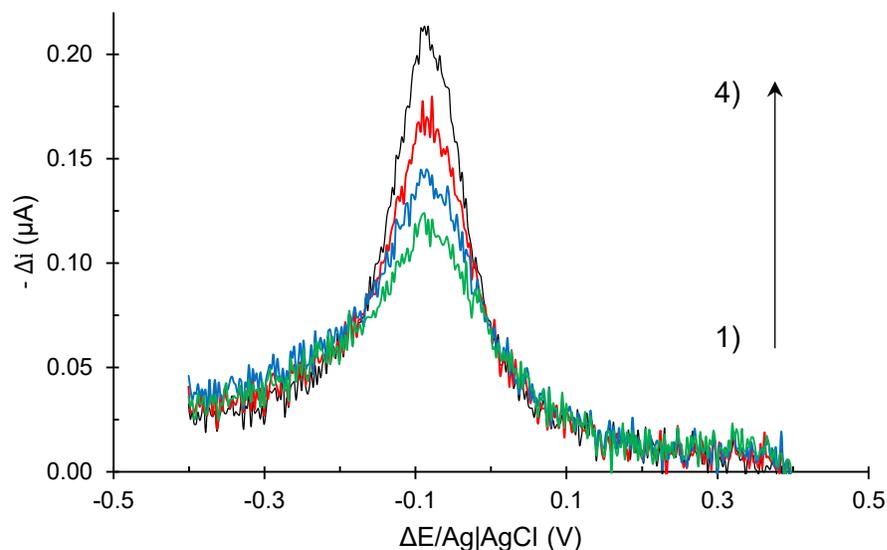


Figura 4.40. Voltamperogramas diferencial de pulsos cíclicos de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 1) en ausencia y en presencia 2) de 0.17, 3) 0.51 y 4) $0.84 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH y utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo.

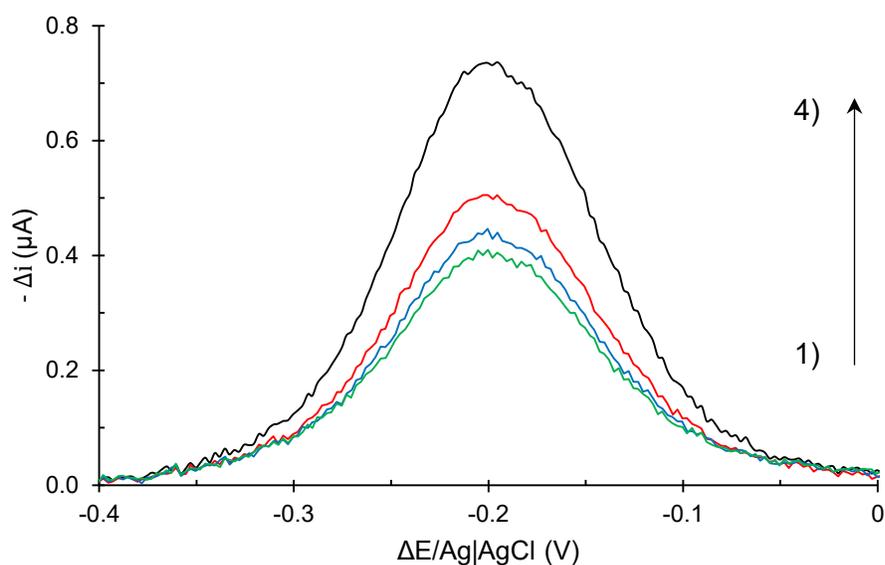


Figura 4.41. Voltamperogramas diferencial de pulsos cíclicos de $176.82 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Casiopeína III-ia en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 1) en ausencia y 2) en presencia de 1.02, 3) 1.18 y 4) $1.35 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH y utilizando carbón vítreo como electrodo de trabajo.

La disminución en los picos de corriente de los voltamperogramas de las figuras anteriores evidencia que la concentración de equilibrio en disolución del Cu(II) y de la Casiopeína III-ia disminuye en presencia de la ASH. Bajo la premisa de que estos compuestos de cobre forman especies no electroactivas con la proteína de suero humano en disolución y asumiendo que se producen especies simples $n\text{Cu(II)-ASH}$ y $n\text{Casiopeína III-ia-ASH}$ la siguiente ecuación es válida^[121, 137 – 140.]



donde CuL puede ser el Cu(II) o la Casiopeína III-ia y n es la relación de unión.

La constante de formación global se puede deducir como:

$$K_f = \frac{[\text{ASH-}n\text{CuL}]}{[\text{ASH}][\text{CuL}]^n} \quad (4.6)$$

Sí ASH- $n\text{CuL}$ no es electroactiva, la disminución del pico de corriente Δi en ausencia y presencia de ASH en disolución es proporcional a la concentración de ASH- $n\text{CuL}$.

$$\Delta i = k[\text{ASH-}n\text{CuL}] \quad (4.7)$$

donde la k engloba las constantes de la ecuación que describen un pico de corriente.

La concentración total de la proteína está definida como:

$$C_{\text{ASH}} = [\text{ASH}] + [\text{ASH-}n\text{CuL}] \quad (4.8)$$

$$\Delta i_{\text{max}} = kC_{\text{ASH}} \quad (4.9)$$

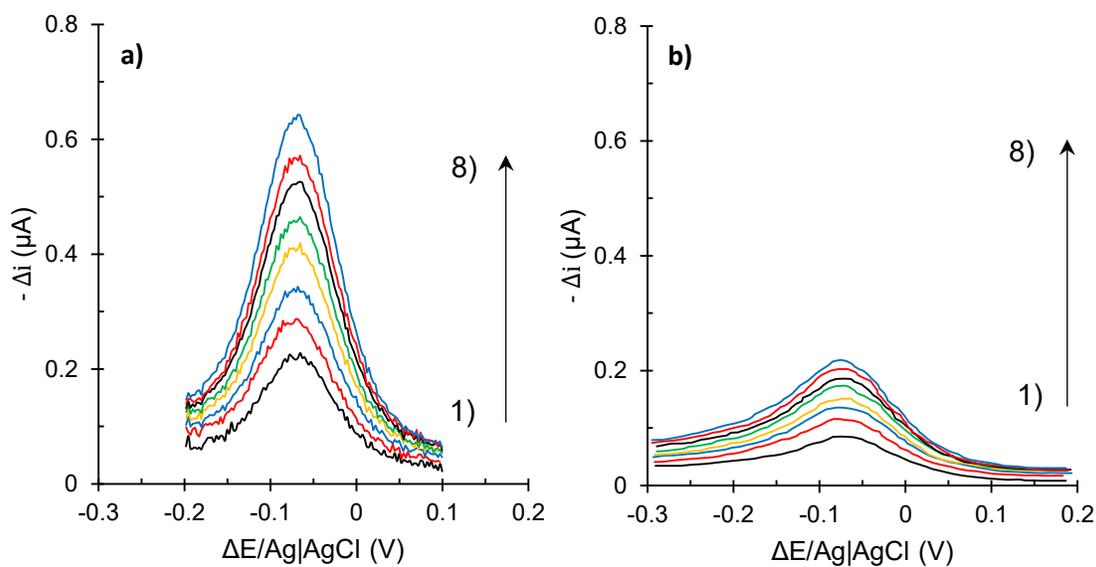
$$\Delta i_{\text{max}} - \Delta i = k(C_{\text{ASH}} - [\text{ASH-}n\text{CuL}]) \quad (4.10)$$

$$\Delta i_{\text{max}} - \Delta i = k[\text{ASH}] \quad (4.11)$$

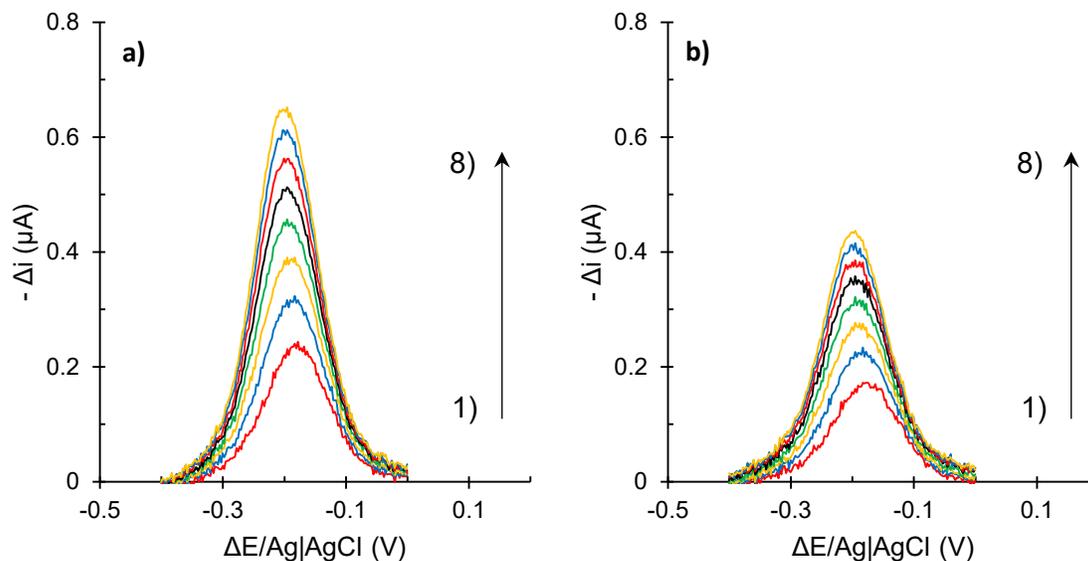
De las ecuaciones 4.7, 4.10 y 4.6 se tiene que:

$$\log\left[\frac{\Delta i}{\Delta i_{\text{max}} - \Delta i}\right] = \log K_f + n\log[\text{CuL}] \quad (4.12)$$

donde Δi es la diferencia en el pico de corriente en presencia y ausencia de proteína de suero humano y Δi_{max} corresponde a valor de diferencia de corriente obtenido cuando la concentración de CuL es mucho mayor que la de la ASH. C_{ASH} , $[ASH]$ y $[ASH-nCuL]$ corresponden a la concentración total, libre y unida de ASH en la disolución, respectivamente. En la figura 4.42 se muestran los voltamperogramas diferencial de pulsos del Cu(II) a distintas concentraciones en ausencia y en presencia de una concentración fija de ASH en disolución. Mientras que la figura 4.43 se muestran los mismos resultados pero obtenidos para la Casiopeína III-ia. Se puede ver claramente en estas figuras como la corriente disminuye considerablemente cuando hay proteína en la disolución. Efecto más evidente para el caso del Cu(II). Demostrando una vez más la formación de una especie $[ASH-nCuL]$ que disminuye la concentración de CuL libre en disolución y por eso disminuye la corriente de pico.

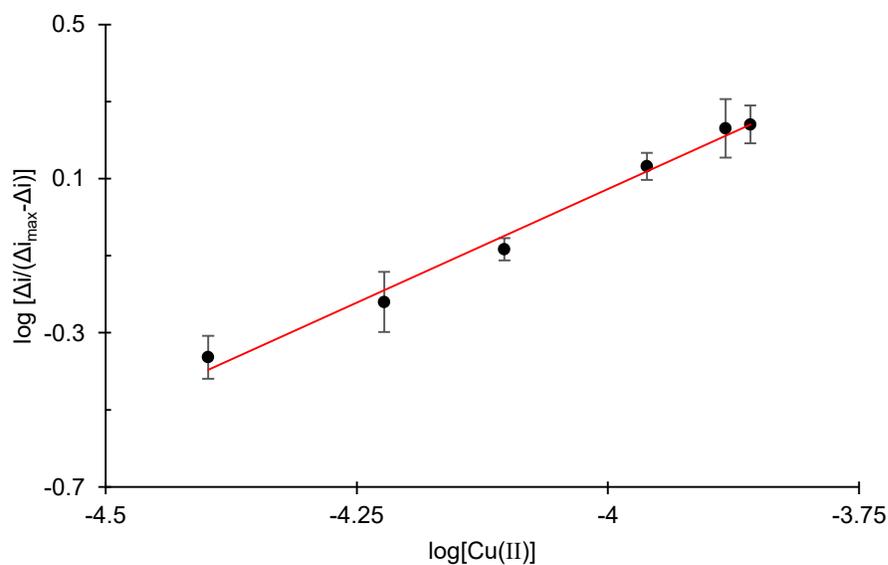


4.42. Voltamperogramas diferencial de pulsos de Cu(II) 1) 40.00, 2) 59.88, 3) 78.88, 4) 109.34, 5) 130.95, 6) 138.61, 7) 158.10 y 8) 177.51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a) en ausencia y b) en presencia de 0.60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 y utilizando como electrodo de trabajo carbón vítreo.

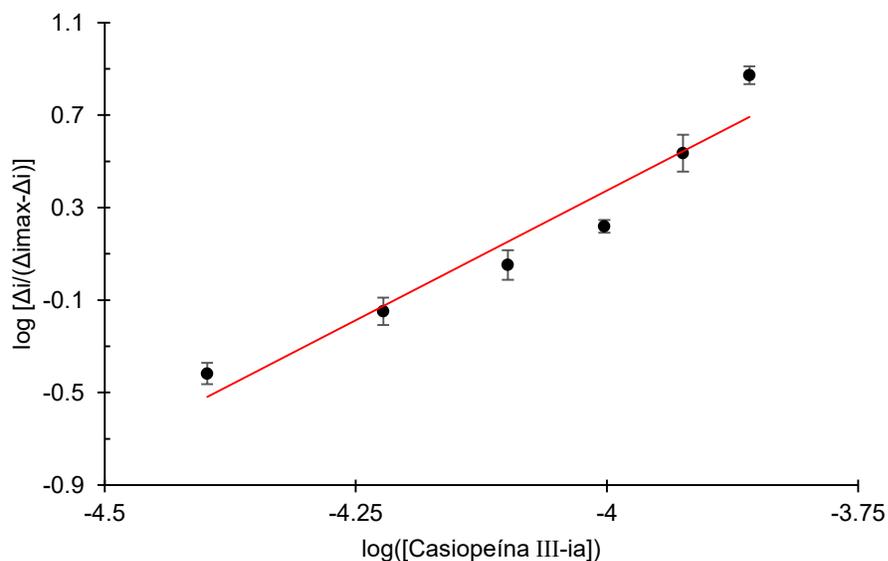


4.43. Voltamperogramas diferencial de pulsos de la Casiopeína III-ia 1) 40.00, 2) 59.88, 3) 78.88, 4) 109.34, 5) 130.95, 6) 138.61, 7) 158.10 y 8) 177.51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a) en ausencia y b) en presencia de 0.40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 y utilizando como electrodo de trabajo carbón vítreo.

En las figuras 4.44 y 4.45 se muestran las gráficas $\log[\Delta i/\Delta i_{max} - \Delta i] = f(\log[\text{CuL}])$ para el Cu(II) y la Casiopeína III-ia respectivamente.



4.44. Relación de $\log[\Delta i/\Delta i_{max} - \Delta i]$ con el ($\log[\text{Cu(II)}]$) en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4.

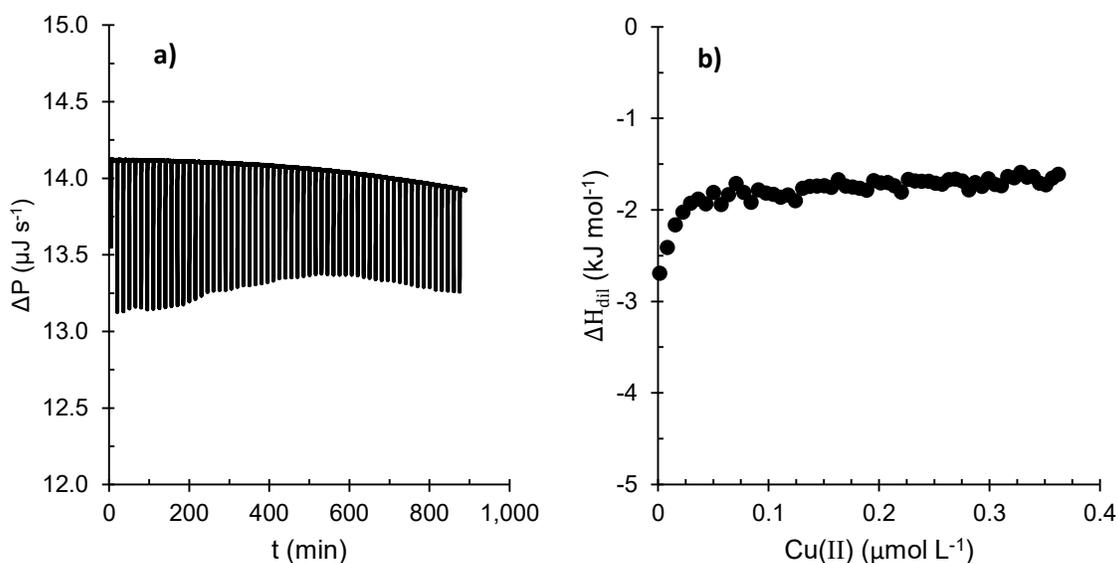


4.45. Relación de $\log[\Delta i/\Delta i_{max} - \Delta i]$ con el $(\log[\text{Casiopéina III-ia}])$ en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$.

Para el caso del Cu(II) se puede observar un buen comportamiento lineal ($r^2 = 0.9881$), lo que sugiere la formación de un único aducto ASH-Cu(II) . El valor de n y de k_f son obtenidos de la pendiente y de la ordenada al origen de esta línea recta los cuales son: $n = 1.18 \pm 0.08$ y $K_f = 6.21 \times 10^4 \pm 0.22 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Esto indica la formación de un aducto estable 1:1 de ASH-Cu(II) . Mientras que para la *Casiopéina III-ia* se puede observar también un buen comportamiento lineal ($r^2 = 0.9304$), pero menor que para el Cu(II) lo que podría significar que la formación de un aducto $\text{ASH-Casiopéina III-ia}$ más complicado. El valor de n y de K_f para este caso son: $n = 2.24 \pm 0.19$ y $K_f = 9.24 \times 10^9 \pm 0.37 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$. Esto indicaría la formación de un aducto estable 2:1 de $\text{ASH-Casiopéina III-ia}$, aunque se debe coleccionar la información de las demás técnicas para sacar conclusiones concretas puesto que el modelo de un aducto único y simple para este sistema es menos descriptivo.

4.1.2 Calorimetría de titulación isotérmica

En la figura 4.46 se muestran los resultados del calor de dilución resultante de titular al Cu(II) disuelto en el amortiguador a pH = 7.4 sobre el mismo medio. Este calor es conocido como el calor de dilución y es muy importante determinarlo antes de realizar la titulación de la proteína tanto para el Cu(II) como para la Casiopeína III-ia, ya que este calor de dilución no forman parte de la reacción de unión y si no es tomado en cuenta puede causar una sub o sobre estimación de los parámetros de unión entre la proteína y los compuestos de cobre en disolución. En la figura 4.46 a) se presentan los resultados de la potencia como función del tiempo, mientras que en 4.46 b) se muestra el calor de dilución, ΔH_{dil} , como función de la concentración de Cu(II) presente en la celda del calorímetro, después de cada adición de 5 μL de una disolución con una concentración 2 mmol L^{-1} .

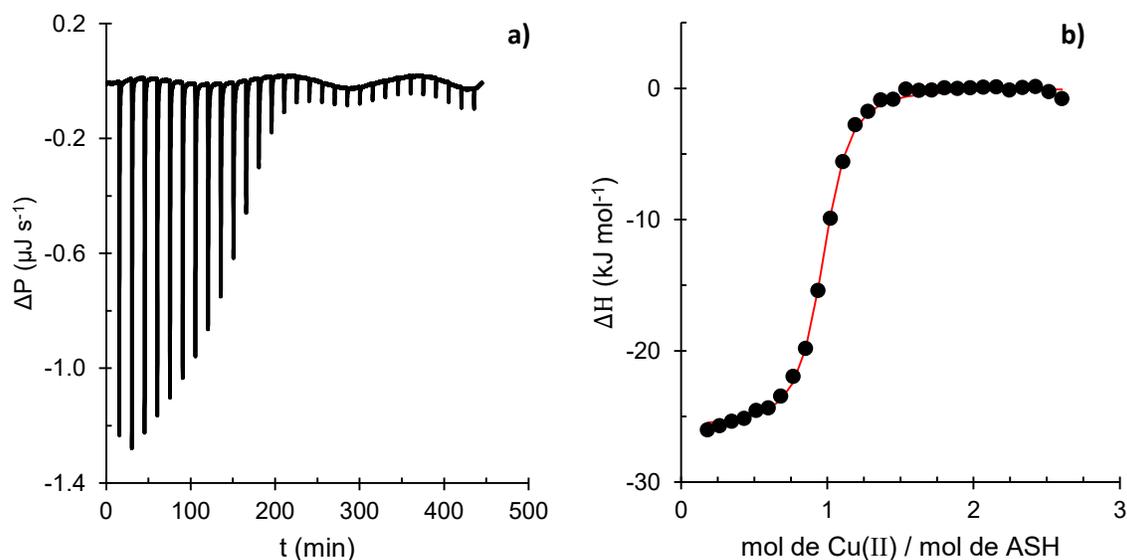


4.46. a) Potencia como función del tiempo y b) el termograma del calor de dilución como función de la concentración de Cu(II) disuelto en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 (a una concentración de 2 mmol L^{-1}) titulado en este medio amortiguador a 25 $^{\circ}\text{C}$.

El calor de dilución del termograma de la figura anterior tiene un valor promedio de $\Delta H_{dil} = -1.78 \pm 0.18 \text{ kJ mol}^{-1}$, lo que dice que es exotérmico. El cual combinado con el calor de dilución de la proteína en la celda del calorímetro dan un valor del calor de dilución también exotérmico de $\Delta H_{dil} = -1.04 \pm 0.08 \text{ kJ mol}^{-1}$, el cual fue

determinado del final de la titulación del experimento de la figura 4.47, este valor fue restado de los experimentos para determinar parámetros de unión entre la proteína y el Cu(II).

En la figura 4.47 a) se presentan los resultados de la potencia como función del tiempo y en 4.47 b) la curva de calorimetría de titulación isotérmica de la albúmina sérica humana titulada con Cu(II) ambos disueltos en 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y 25 °C. La curva tiene la forma típica de una sigmoidea exotérmica, con punto de inflexión cerca del punto de saturación de la macromolécula (indicando la estequiometría de la reacción), y que termina en un valor cercano a 0 kJ mol⁻¹ porque la reacción ha terminado. La sigmoidea fue ajustada al modelo de una solo sitio de unión obteniendo una χ^2 (chi-cuadrada) de 0.076 lo que significa que el ajuste con este modelo es bueno.

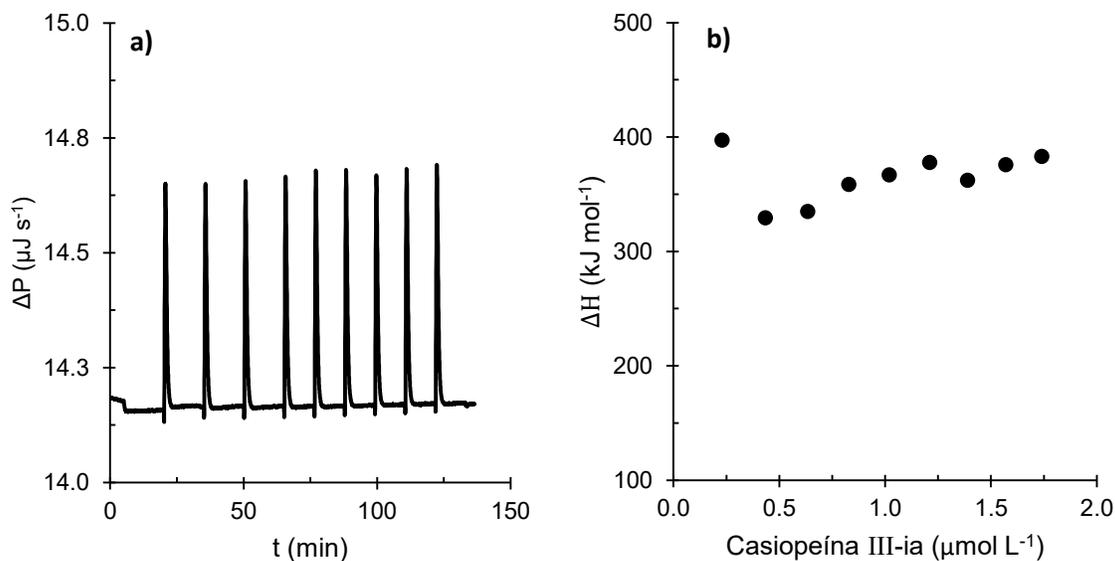


4.47. a) Potencia como función del tiempo y b) curva de calorimetría de titulación isotérmica de la albúmina sérica humana (0.086 mmol L⁻¹, en la celda) titulada con Cu(II) (2 mmol L⁻¹, en la jeringa) ambos en 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y 25 °C. Resultados experimentales (círculos) y ajuste a los datos experimentales con el modelo de un solo sitio de unión (línea continua).

Los parámetros obtenidos de este ajuste son: la estequiometría de la reacción $n = 0.939 \pm 0.003$, la constante de formación del aducto Cu(II)-ASH $K_f = 1.32 \times 10^6 \pm 7.44 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, la entalpía de formación $\Delta_f H = -25.80 \pm 0.126 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $\Delta_f S =$

$27.9 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Por lo que se puede entonces calcular el valor de la energía libre de Gibbs a partir de la K_f , la cual tiene un valor de $\Delta_f G = -34.93 \pm 0.19 \text{ kJ mol}^{-1}$. Se puede observar que la energía libre de Gibbs tiene un valor negativo lo que indica que la unión entre el Cu(II) y la ASH es termodinámicamente espontánea. Con base en la entalpía la reacción es exotérmica y el valor de la entropía es positivo lo que indica un aumento en el número de microestados posibles. La estequiometría de unión es 1:1, lo cual está de acuerdo con lo observado mediante técnicas electroquímicas y a lo reportado en la literatura^[141 – 144]. En el caso de la constante de formación el valor obtenido mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica es dos órdenes de magnitud mayor a la obtenida mediante voltamperometría diferencial de pulsos. Lo cual no significa que una este correcta y a otra no. A diferencia de la técnica electroquímica donde se siguió la concentración de la especie ASH-Cu(II) la calorimetría es muy sensible a cualquier reacción en disolución no solo a la de interés. Como ya se mencionó anteriormente el Cu(II) en la disolución de Tris-HCl no se encuentra libre si no que está coordinado en distintas formas con la sal amortiguadora. Por lo que la calorimetría podría estar detectando la ruptura de los enlaces entre el Cu(II) y el Tris además de la formación de los enlaces entre los residuos de aminoácidos del sitio activo de la albúmina humana.

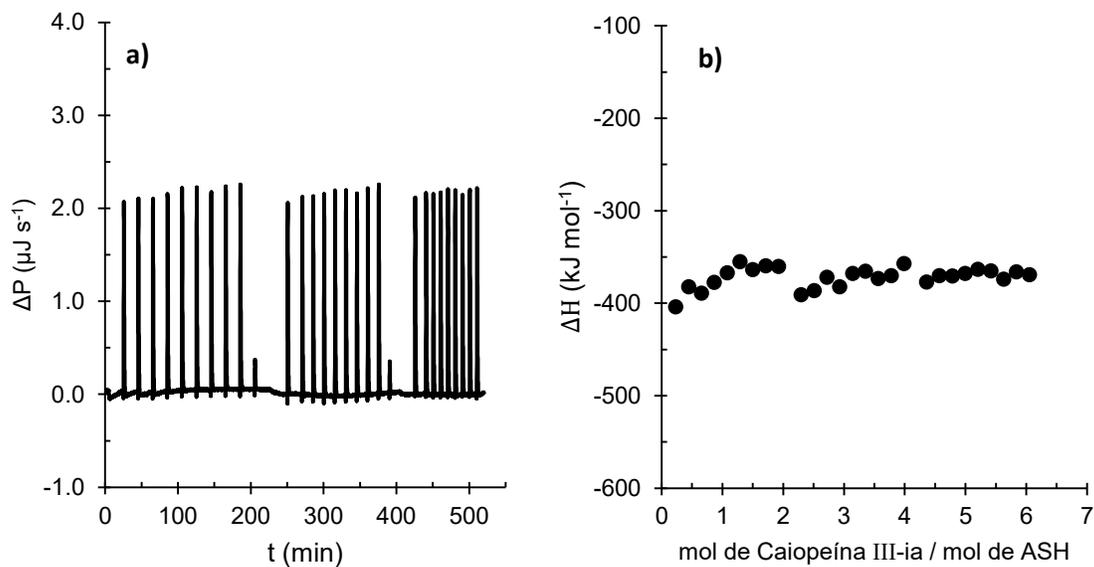
En la figura 4.48 a) se muestran los resultados de la potencia como función del tiempo y en 4.48 b) el calor de dilución como función de la concentración de la Casiopeína III-ia presente en la celda del calorímetro después de cada adición de $30 \mu\text{L}$ de una disolución de esta en el medio amortiguado con una concentración de 0.01 mmol L^{-1} y titulado en el mismo medio. Este calor de dilución es endotérmico de $\Delta H_{dil} = 365.14 \pm 21.94 \text{ kJ mol}^{-1}$. Cuando la proteína albúmina sérica humana se encuentra en la celda del calorímetro a una concentración $0.001 \text{ mmol L}^{-1}$ y se le añade el medio amortiguado a las mismas condiciones que el resultado anterior, genera un calor de dilución exotérmico de $-9.97 \pm 1.10 \mu\text{J inyección}^{-1}$. Estos valores serán restados de los experimentos para determinar parámetros de unión entre la proteína y la Casiopeína III-ia



4.48. a) Potencia como función del tiempo y b) calor dilución como función de la concentración de la Casiopeína III-ia disuelta en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ (a una concentración de 0.01 mmol L^{-1}) titulado en este medio amortiguador a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

En el caso de la Casiopeína III-ia se realizó un experimento similar titulado la ASH, el cual se muestra en la figura 4.49, donde para este sistema no se observa una sigmoidea pero si un valor de calor exotérmico constante $\Delta H = -372.21 \pm 11.26 \text{ kJ mol}^{-1}$ hasta una relación molar de 6 a 1 entre la Casiopeína III-ia y la ASH, respectivamente. Este resultado significa que si hay una interacción entre la Casiopeína y la albúmina sérica humana, esa interacción es considerable energéticamente y que la interacción no es de tipo específica, no hay formación de enlaces entre la Casiopeína y algunos residuos de aminoácidos en la proteína. Porque además esto significaría la separación de uno o de los dos ligantes de la molécula de Casiopeína III-ia, entonces lo que formaría una unión con la proteína ya no sería la molécula que en principio es la que presenta la actividad biológica. Entonces la interacción se podría estar dando únicamente por interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas de la Casiopeína con la superficie de la proteína. Lo cual explicaría porque el modelo para el análisis electroquímico no ajusta del todo bien. Pero de manera práctica esto podría ser una ventaja ya que, si existe una interacción y sí se piensa en la ASH como un vehículo para el transporte de la Casiopeína III-ia en el cuerpo humano entonces el hecho de no existir una

interacción específica facilitaría su liberación en donde sea requerida para realizar su función quimioterapéutica. Aunque se debe considerar que, por simple hecho de existir una interacción eso no quiere decir que exista también un transporte.



4.49. a) Potencia como función del tiempo y b) curva de calorimetría de titulación isotérmica de la albúmina sérica humana ($0.001 \text{ mmol L}^{-1}$, en la celda) titulada con Casiopeína III-ia (0.01 mmol L^{-1} , en la jeringa) ambos en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.1.3 Calorimetría de diferencial de barrido

En la figura 4.50 y 4.51 se presentan los experimentos de calorimetría diferencial de barrido para el Cu(II) y la Casiopeína III-ia en disolución 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4, que simula condiciones fisiológicas. En ambas gráficas se puede observar que a las condiciones de trabajo el Cu(II) y la Casiopeína III-ia no sufren transición térmica alguna.

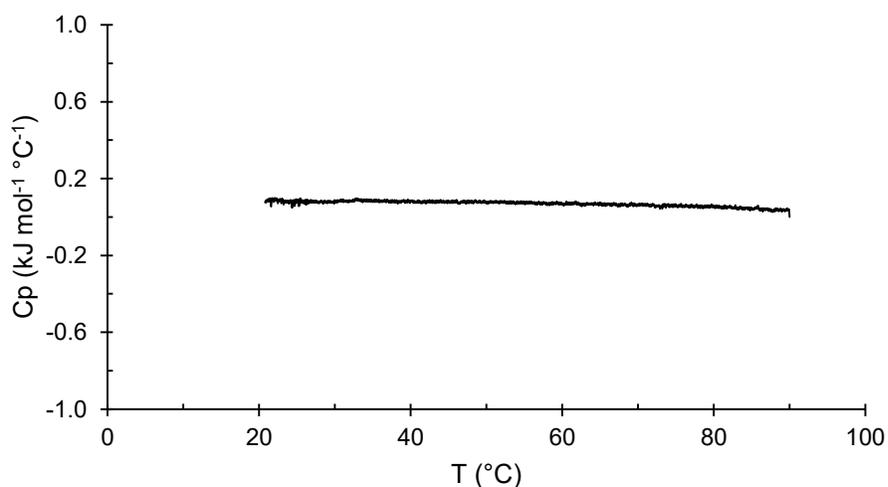


Figura 4.50. Experimento de calorimetría diferencial de barrido de 0.1 mmol L⁻¹ de Cu(II) en 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4, a una velocidad de barrido de 60 °C min⁻¹.

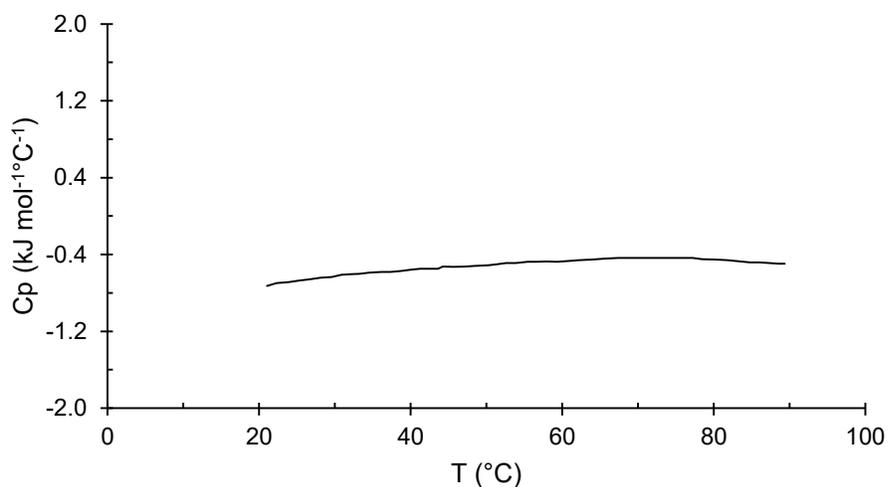


Figura 4.51. Experimento de calorimetría diferencial de barrido de 0.1 mmol L⁻¹ de Casiopeína III-ia en 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4, a una velocidad de barrido de 60 °C min⁻¹.

Por otro lado, en la figura 4.52 se muestra la traza calorimétrica de la albúmina humana. Esta traza es irreversible, por lo que solo se muestra la curva para el primer barrido. La irreversibilidad está dada por un efecto de agregación que presenta la proteína después de pasar del estado nativo al desplegado, evidenciado por la aparición de turbidez cuando la disolución de proteína fue retirada de la celda del calorímetro después del experimento y por el hombro que se observa en la traza, mismo que está relacionado con la cantidad de ácidos grasos que contienen la proteína^[90].

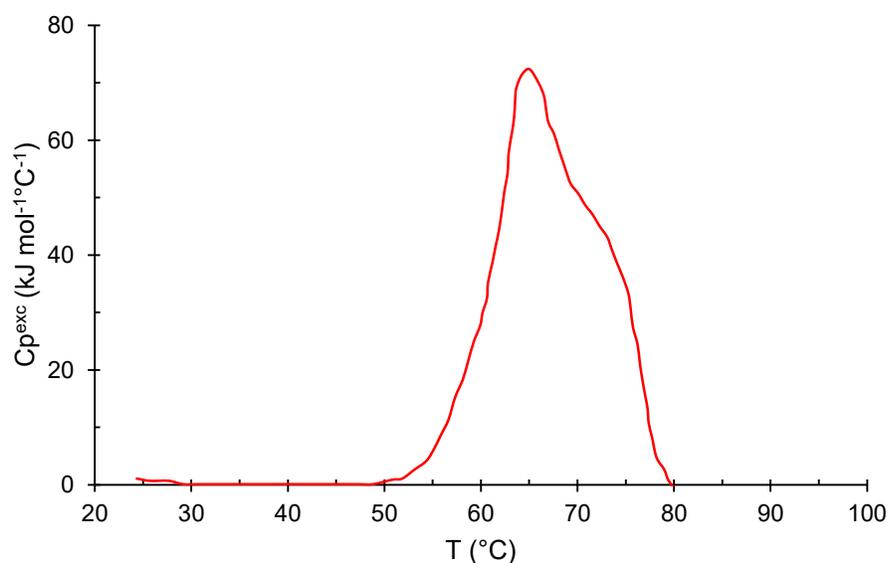


Figura 4.52. Traza calorimétrica de la ASH a una concentración de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ en 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl a $\text{pH} = 7.4$ a una velocidad de barrido de $60 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$.

4.4. Parámetros termodinámicos del proceso de desplegamiento inducido por temperatura de la albúmina de suero humano.

Amortiguador	pH	T_m ($^\circ\text{C}$)	$\Delta_R^0 H$ (kJ mol^{-1})	Velocidad de barrido ($^\circ\text{C h}^{-1}$)	Ácidos grasos	Referencia
Tris-HCl	7.4	65.77 ± 0.90	967.03 ± 22.88	60	No	Este trabajo
Fosfatos	7.4	56.1 ± 0.1	412.54 ± 31.80	60	No	151
Fosfatos	7.4	63.2 ± 0.4	371.96 ± 19.24	60	No	152
Fosfatos	7.4	79.5 ± 0.2	1131.77 ± 15.48	60	Si	153
Fosfatos	7.4	79.9 ± 0.2	1119.22 ± 5.02	60	No	153
Tris-HCl	7.3	64.85	595 ± 3	30	No	154

Los parámetros termodinámicos del proceso de desplegamiento de la proteína, inducido por temperatura, fueron obtenidos de la traza de la albúmina humana empleando un análisis termodinámico. Esto no es del todo correcto puesto que la proteína presenta agregación después de su desnaturalización convirtiéndose en un sistema irreversible, entonces no es un sistema en equilibrio y por lo tanto el análisis termodinámico no se aplica para un sistema de este tipo. Sin embargo, es una aproximación que esta reportada en la literatura por diversos grupos de investigación y ha servido para poder obtener conclusiones sobre el desplegamiento térmico de la proteína^[145 - 154]. Estos parámetros son $T_m = 65.77 \pm 0.90$ °C, $\Delta_N^D H = 967.03 \pm 22.88$ kJ mol⁻¹, $T_{1/2} = 13.30 \pm 1.85$. En la tabla 4.4 se muestran los parámetros termodinámicos del proceso de desplegamiento inducido por temperatura en las condiciones más similares a las de este trabajo y que son regularmente citados en la literatura.

Se puede observar en la tabla 4.4 que los resultados obtenidos de los parámetros termodinámicos se encuentran dentro de los valores reportados en la literatura. La mayoría de los trabajos son realizados en medios amortiguados con sales de fosfatos, pero usar una sal de fosfatos para el estudio de interacción de catión metálico proteína no es lo más adecuado puesto que estas sales tiene un capacidad de formar compuestos de coordinación con estos cationes con diversas estequiometrias y altas constantes de formación^[100]. A pesar de estos hechos, sería interesante estudiar cómo afecta la sal amortiguadora y su capacidad coordinante con el catión metálico con que se desea poner en contacto con la proteína. Se puede observar que los valores reportados de T_m y $\Delta_N^D H$ son dispersos entre sí. Para el caso de la T_m existen valores con más de 20 °C de diferencia y para la $\Delta_N^D H$ se pueden ver valores con discrepancias que representan el 30% del valor entre uno y otro aun trabajando en el mismo medio amortiguador. Esto es un hecho que ya se ha estudiado y se ha llegado a la conclusión de que el material que se comercializa como albúmina sérica humana es muy heterogéneo, y los parámetros termodinámicos que se obtengan dependerán en gran medida de la pureza de la proteína y del tratamiento de purificación y diálisis que se le dé a la proteína antes de hacer un experimento de calorimetría diferencial de barrido.

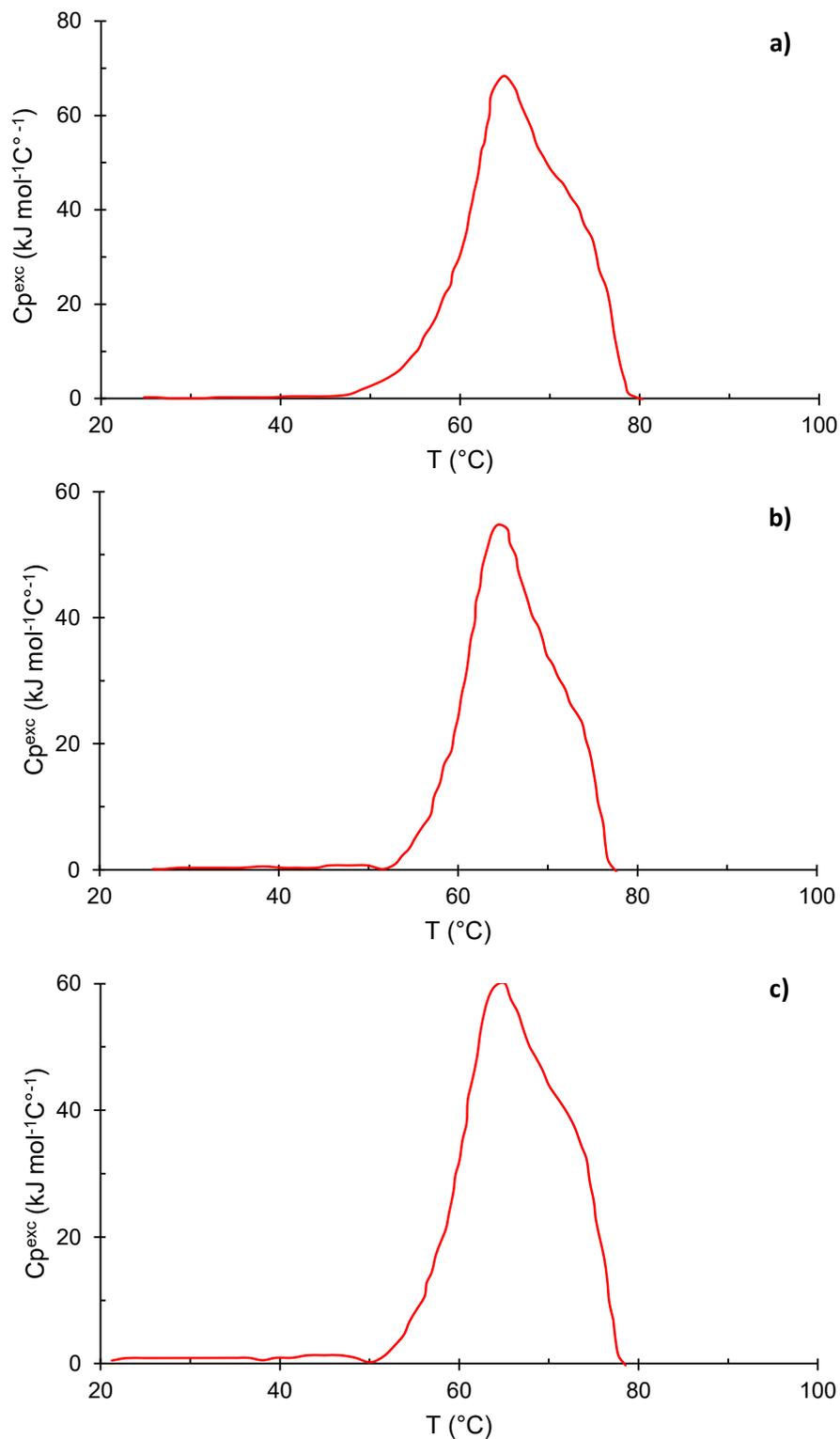


Figura 4.53. a) Traza calorimétrica de la ASH a una concentración de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $7.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu(II) b) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ASH y $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu(II) y c) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH y $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu(II) en 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl a $\text{pH} = 7.4$ a una velocidad de barrido de $60 \text{ }^{\circ}\text{C h}^{-1}$.

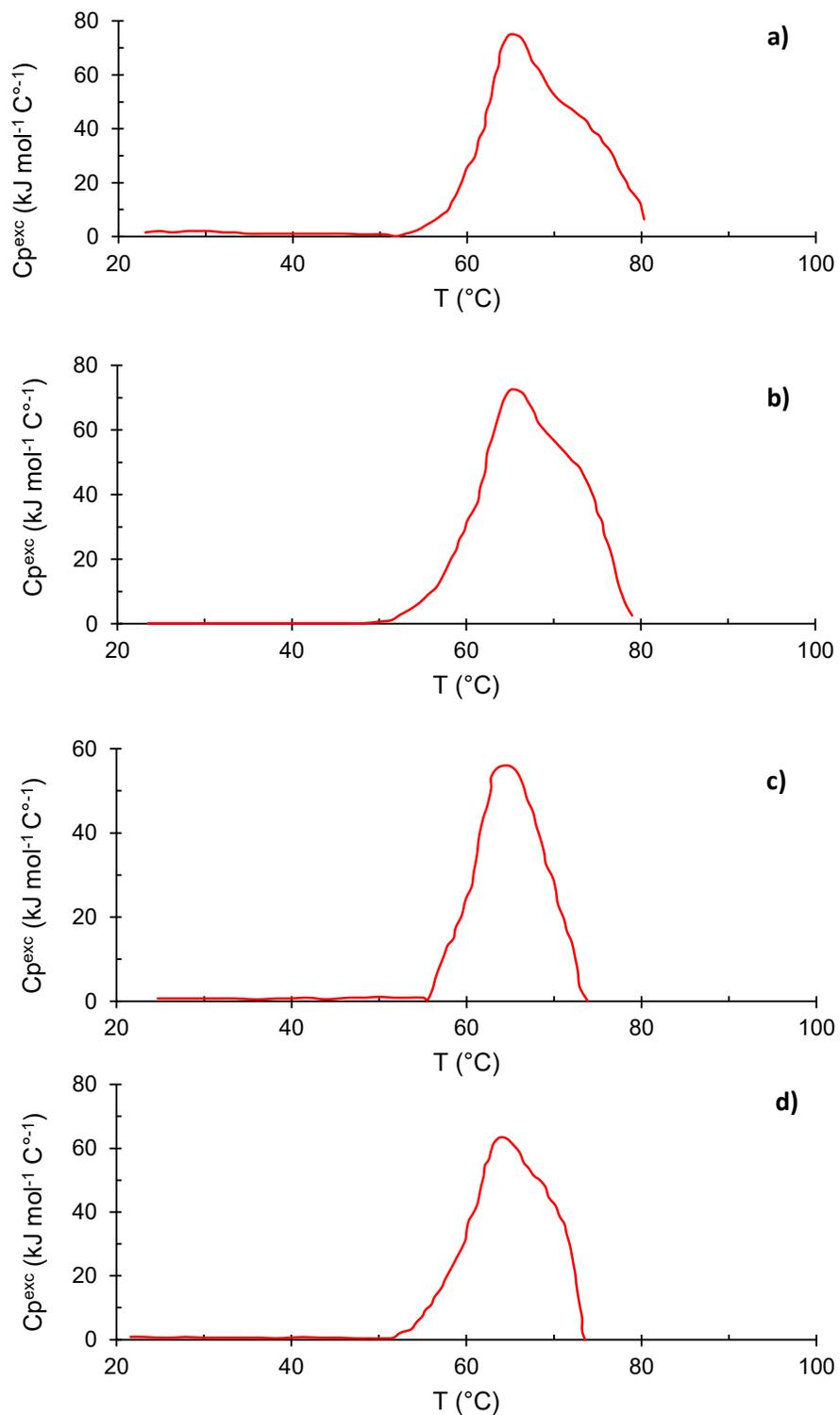


Figura 4.54. a) Traza calorimétrica de la ASH a una concentración de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Casiopeína III-ia, b) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH y $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Casiopeína III-ia, c) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH y $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Casiopeína III-ia y d) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH y $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Casiopeína III-ia en 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl a $\text{pH} = 7.4$ a una velocidad de barrido de $60 \text{ }^{\circ}\text{C h}^{-1}$.

Para estudiar la interacción del Cu(II) y de la Casiopeína III-ia con la ASH mediante calorimetría diferencial de barrido se realizaron experimentos manteniendo fija la concentración de ASH e iguales condiciones que para los experimentos de la figura 4.52 pero variando la concentración tanto de Cu(II) como de Casiopeína III-ia en disolución. En la figura 4.53 se muestran a) una traza calorimétrica de una disolución de ASH y Cu(II) con una relación de concentración 1:0.5, b) 1:1 y c) 1:3. Por otro lado en la figura 4.54 se muestran las trazas calorimétricas a) de una disolución de ASH y Casiopeína III-ia 1:1, b) 1:2, c) 1:5 y d) 1:50. En la tabla 4.5 se resumen los datos termodinámicos obtenidos de las trazas calorimétricas presentadas en las figuras 4.53 y 4.54 obtenidos de un análisis termodinámico y comparados con los obtenidos de la figura 4.52 y que se encuentran resumidos en la tabla 4.4.

Tabla 4.5. Parámetros termodinámicos obtenidos de las trazas calorimétricas de las figuras 4.52, 4.53 y 4.54.

Disolución	$\Delta_N^D H$ (kJ mol ⁻¹)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
ASH	967.03 ± 22.88	67.77 ± 0.90	13.30 ± 1.85
ASH-Cu(II) 1:0.5	952.42	65.01	13.75
ASH-Cu(II) 1:1	654.87	64.30	11.54
ASH-Cu(II) 1:3	831.10	64.83	14.24
ASH-Casiopeína III-ia ia 1:1	976.84	65.60	11.71
ASH-Casiopeína III-ia 1:2	1003.67	66.06	13.88
ASH-Casiopeína III-ia 1:5	504.09	65.12	8.74

Para el caso donde la proteína está en disolución con Cu(II) los parámetros termodinámicos T_m y $T_{1/2}$ no se modifican de manera significativa para ninguna relación de concentraciones, en comparación con la proteína libre, al igual que para la entalpía de desnaturalización cuando la relación de concentraciones de ASH y Cu(II) es 1:0.5, respectivamente. Lo que significa que a estas condiciones la estabilidad térmica de la albúmina no se modifica. Pero por otro lado para la entalpía de desnaturalización cuando la relación de concentraciones de ASH y Cu(II) es la misma esta disminuye en más de 300 kJ mol⁻¹ lo que significa que la energía para este proceso es menor y por lo tanto la estructura terciaria de la proteína en presencia de Cu(II) se ve afectada. Ahora bien cuando la relación de

concentraciones de ASH y Cu(II) es de 1:3 la entalpía de desnaturalización si se ve afectada, disminuye solo un poco más de 100 kJ mol^{-1} . A diferencia de lo que ocurría con la relación de concentración 1:1 por lo que parecería que la proteína a estas condiciones mantiene mayor conservada su estructura terciaria.

Cuando la proteína albúmina sérica humana está en disolución con la Casiopeína III-ia los parámetros termodinámicos se modifican de diferente manera que con el Cu(II), comparando con la ASH libre, una vez más las T_m y $T_{1/2}$ no se ven afectadas significativamente. A excepción de la $T_{1/2}$ en la relación de concentración 1:5 donde esta disminuye $2.5 \text{ }^\circ\text{C}$ lo que indicaría que el proceso de desnaturalización inducida por temperatura a estas es más cooperativo. Si revisamos los valores de la entalpía de desnaturalización cuando las relaciones de concentraciones de ASH y Casiopeína III-ia es 1:1 y 1:2 se mantiene sin cambios significativos, algo similar a lo que ocurría con Cu(II) a una relación 1:0.5. Esto dice que para estos sistemas y a estas condiciones la ASH y su proceso de desnaturalización inducido por temperatura no se modifican y como consecuencia la estructura terciaria de la proteína no se ve afectada por estar en contacto con estos compuestos. En el caso donde la relación de concentraciones de ASH y Casiopeína es de 1:5 la entalpía de desnaturalización disminuye alrededor de 463 kJ mol^{-1} , un número mayor a lo que observa con los sistemas anteriores por lo que la proteína necesita menor energía para ser llevada a este estado desnaturalizado. Afectando entonces de manera importante la estructura terciaria de la ASH. Con estos resultados se puede entonces entender que si existe una interacción del Cu(II) y la Casiopeína III-ia con la con la albúmina sérica humana provocando un efecto en la estructura terciaria de la proteína la cual como consecuencia disminuye a energía necesaria para desnaturalizar a la albúmina humana.

4.1.4 Espectrofotometría ultravioleta y visible

En la figura 4.55 se muestran los espectros de absorción del agua desionizada, una disolución 0.1 mol L⁻¹ de KCl, y el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 que simula las condiciones fisiológicas. Se puede ver que tanto el agua, el agua con KCl y el medio amortiguado presentan varias regiones de absorción en todo el intervalo y la gran diferencia entre los tres espectros es que el máximo de absorción en 275 nm tiene una absorbancia de 0.055 para el agua, 0.067 para la disolución de KCl y 0.085 para el medio a pH controlado. Estos espectros serán restados, según corresponda, a todos los espectros mostrados en los resultados.

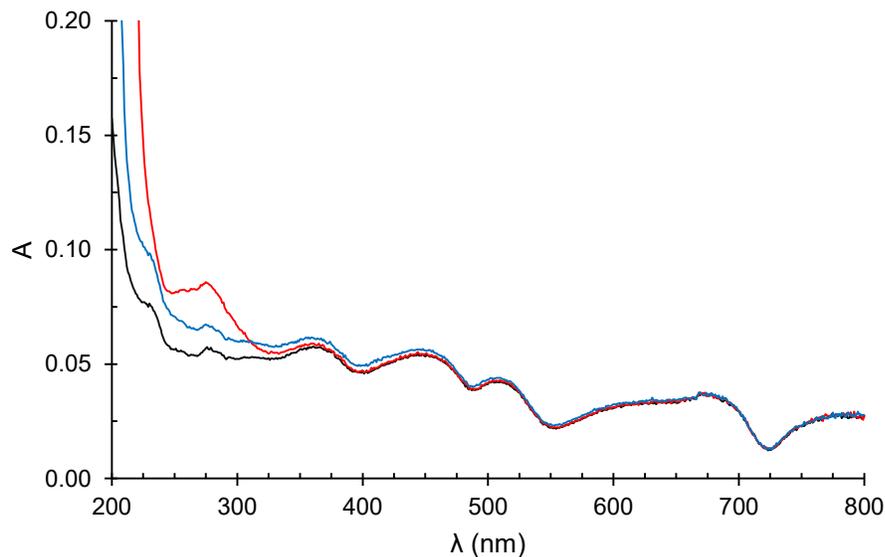


Figura 4.55. Espectros de absorción del agua (línea negra), disolución 0.1 mol L⁻¹ KCl (línea azul) y del medio amortiguado de 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl a pH = 7.4 (línea roja) a 25 °C.

En la figura 4.56 se muestra el espectro de absorción de la proteína albúmina sérica humana a una concentración de 5.77 μmol L⁻¹ desde 200 y hasta 800 nm a una temperatura de 25 °C. La proteína presenta un máximo de absorción a 278 ± 0.5 nm. Para el cálculo de la concentración de la proteína después de ser dializada así como para cualquier tratamiento de datos se utilizó como coeficiente de absorptividad molar de la proteína un valor de 37,500 L mol⁻¹ cm⁻¹[155].

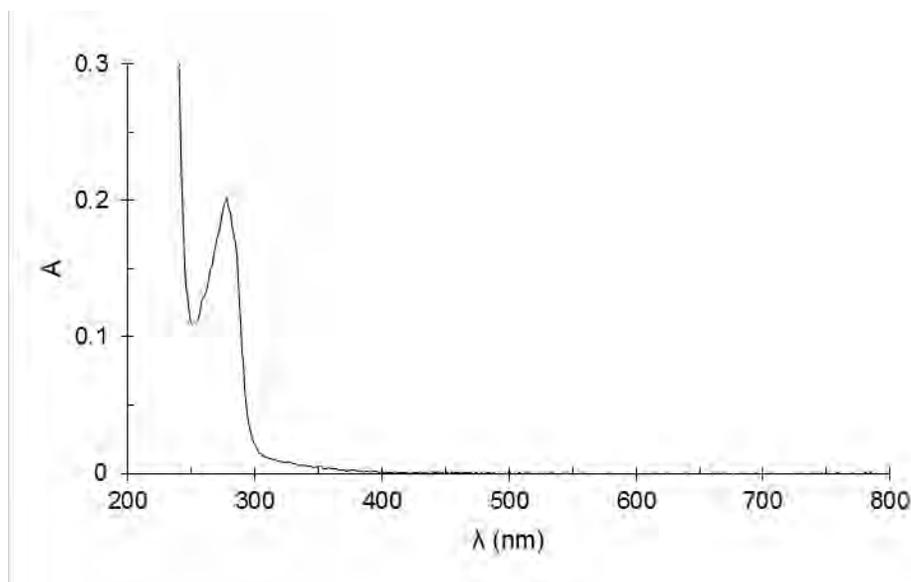


Figura 4.56. Espectro de absorción de $5.77 \mu\text{mol L}^{-1}$ de la proteína albúmina sérica humana en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ a 25°C .

El Cu(II) disuelto en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl y 0.1 mol L^{-1} de KCl presenta un máximo de absorción que se desplazan de menor a mayor longitud de onda como función de la concentración desde los 642 nm a una concentración de 1 mmol L^{-1} y hasta los 750 nm a 10 mmol L^{-1} , los espectros son mostrados en la figura 4.57. Estos cambios en el máximo de absorción demuestran, una vez más, que existen diferentes especies de Cu(II) coordinadas con la sal del medio y al cambio del pH que produce este catión metálico al estar en disolución como se muestra en las figuras 4.5 y 4.7, por ejemplo a 10 mmol L^{-1} la especie predominante es $\text{CuH}_{-1}\text{L}_2^+$ pero solo con una fracción mol de 0.38 y cuando se tiene una concentración de Cu(II) 1 mmol L^{-1} esta misma especie representa un 0.8 de fracción mol. En la figura 4.58 se muestra el cambio de longitud de onda como función de la concentración del Cu(II) en disolución en la cual se puede ver que entre 1 y 2 mmol L^{-1} el máximo de absorción es el mismo, lo que indica que entre estas concentraciones la especie de Cu(II) coordinada al Tris es la misma o que al menos una es la predominante ($\text{CuH}_{-1}\text{L}_2^+$). Pero al pasar a 3 y 4 mmol L^{-1} se vuelve a observar un cambio en el máximo de absorción para después seguir modificándose hasta la concentración de 10 mmol L^{-1} . Demostrando así, que el cambio en el pH (figura 4.7) de la disolución por el hecho de la adición del Cu(II) a la disolución también tendrá una fuerte

influencia en la especie de Cu(II) que se esté monitoreando según sea la concentración de trabajo, como se vio también en la figura 4.5.

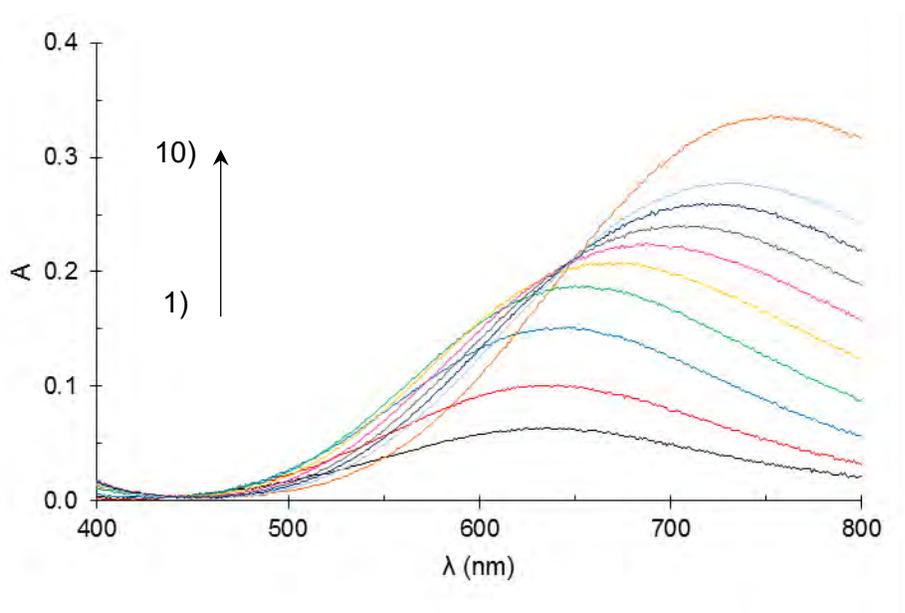


Figura 4.57. Espectros de absorción del Cu(II) en la región del visible como función de la concentración 1) 1, 2) 2, 3)3, 4) 4, 5) 5, 6) 6, 7) 7, 8) 8, 9) 9 y 10) 10 mmol L⁻¹ disuelto en el medio de 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl y 0.1 mol L⁻¹ de KCl a 25 °C.

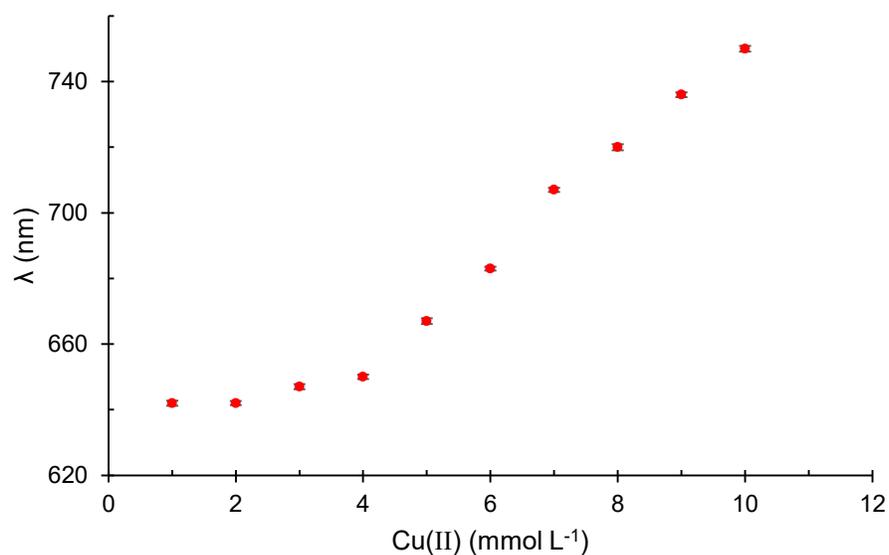


Figura 4.58. Máximos de absorción del Cu(II) en la región del visible como función de la concentración disuelto en el medio 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl y 0.1 mol L⁻¹ de KCl a 25 °C.

En la región del ultravioleta el detector del espectrofotómetro es saturado desde una concentración de 0.6 mmol L⁻¹, como se puede ver en la figura 4.59. Los espectros

en la región del ultravioleta a concentraciones del orden de $\mu\text{mol L}^{-1}$, las cuales son las más adecuadas para los estudios con proteínas, se muestran en la figura 4.60.

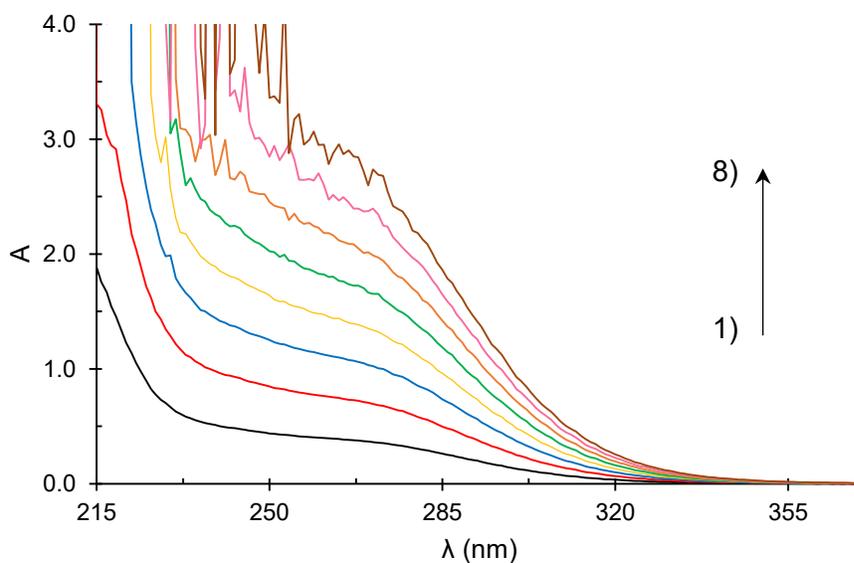


Figura 4.59. Espectros de absorción del Cu(II) en la región del ultravioleta como función de la concentración 1) 100, 2) 200, 3) 300, 4) 400, 5), 500, 6) 600, 7) 700 y 8) 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 y 25 °C.

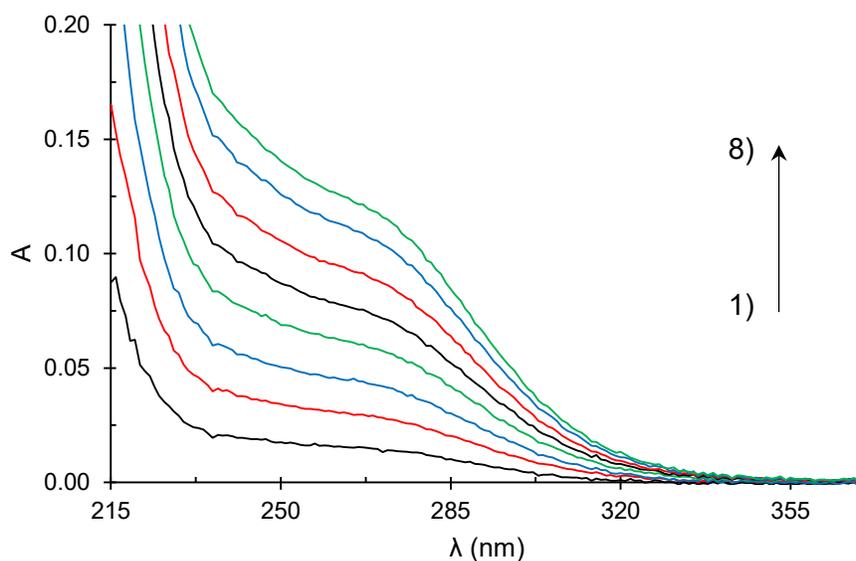


Figura 4.60. Espectros de absorción del Cu(II) en la región del ultravioleta como función de la concentración 1) 5, 2) 10, 3) 15, 4) 20, 5) 25, 6) 30, 7) 35 y 8) 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 y 25 °C.

En este caso el máximo de absorción se encuentra en 267.0 ± 0.4 nm, al estar tan cercano a los 200 nm pareciera más un hombro, pero se conserva el máximo de absorción. Indicando que a estas concentraciones la especie o especies de cobre se conservan igual. Por lo que se puede entonces determinar el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) graficando el máximo de absorción como función de la concentración, como se muestra en la gráfica de la figura 4.61 la cual se ajusta a una ecuación de una línea recta $A_{267 \text{ nm}} = 3019.2 C_{\text{Cu(II)}}(\text{mol L}^{-1}) - 1 \times 10^{-3}$ ($r^2 = 0.9996$). Por lo tanto $\epsilon = 3019.2 \pm 7.8 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

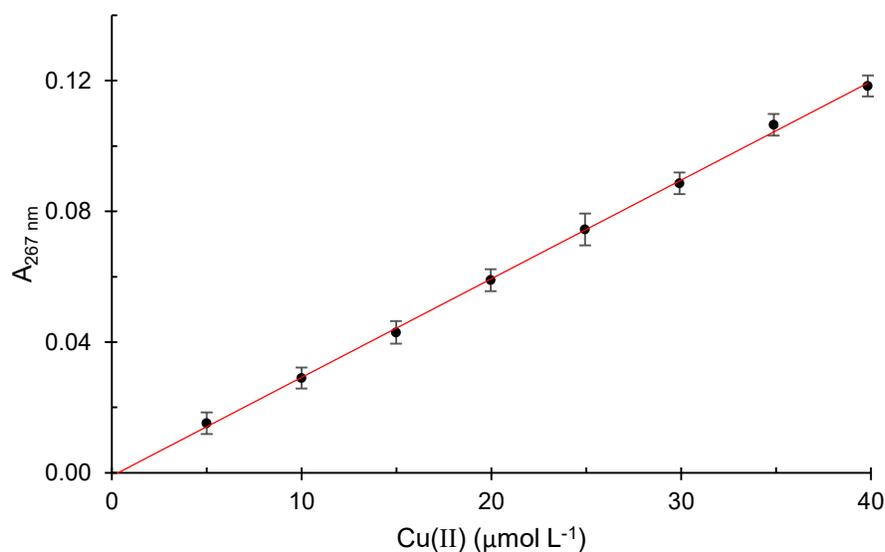


Figura 4.61. Absorbancia, 267 nm, como función de la concentración del Cu(II) en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se comparó como es que se observan los espectros del Cu(II) disuelto únicamente en agua y una disolución 0.1 mol L^{-1} de KCl a una concentración de 1 y 10 mmol L^{-1} , los cuales se muestran en la figura 4.62. En estos se puede ver que a pesar del cambio de concentración, el espectro conserva sus máximos y que el hecho de estar en agua o en la disolución de KCl no los modifica puesto que éstos se superponen, indicando que las especies de cobre en disolución se mantienen constantes con la concentración. Se observa en el caso de los espectros a una concentración de 10 mmol L^{-1} en la región del visible éstos se parecen más al espectro en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl. Debemos recordar que el pH de las disoluciones de Cu(II) en agua son 5.37 para 1 mmol L^{-1} y 4.73 para 10 mmol L^{-1} . El cobre 10 mmol

L^{-1} en el medio de Tris-HCl da un pH de 5.47. A estos valores de pH el cobre se encuentra prácticamente como $Cu(II)$ libre y esta es la razón por la cual estos espectros son más similares entre sí. En la zona del ultravioleta, si se comparan las figuras 4.60 y 4.62, es evidente que los espectros en disolución de Tris-HCl y en agua son muy diferentes lo que continúa evidenciando la presencia de diferentes especies de $Cu(II)$ según sea el disolvente y el pH.

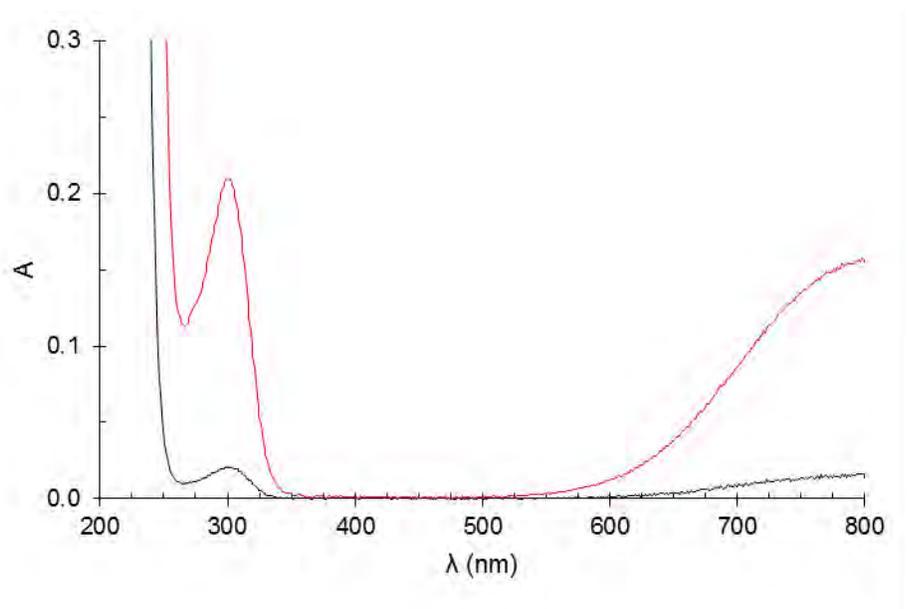


Figura 4.62. Espectros de absorción del $Cu(II)$ 1 mmol L^{-1} (línea negra) y 10 mmol L^{-1} (línea roja) en agua y 0.1 mol L^{-1} de KCl trazados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Por otro lado la Casiopeína III-ia tiene como ligantes bidentados una unidad de acetilacetato, el cual es la base conjugada de la acetilcetona. Esta se comporta en medio acuosos o mezclas de disolventes como un ácido débil con un pK_a que va desde 8.8 a 9 en agua dependiendo de la fuerza iónica. Mientras que en mezclas de disolventes orgánicos y agua puede ir desde 9.8 en mezcla etanol agua y 13.4 en dimetilsulfóxido^[156]. En el medio amortiguado de trabajo este compuesto presenta un máximo de absorción a 283 nm (espectro figura 4.63 a). El otro ligante, también bidentado, es una unidad de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina la cual presenta dos máximos de absorción en su espectro de absorción, el primero en 239 nm y el segundo en 280 nm (figura 4.63 b). Ambos ligantes solo absorben en la región del ultravioleta y fueron trazados para diferenciar estos espectros con los de la Casiopeína en esta región.

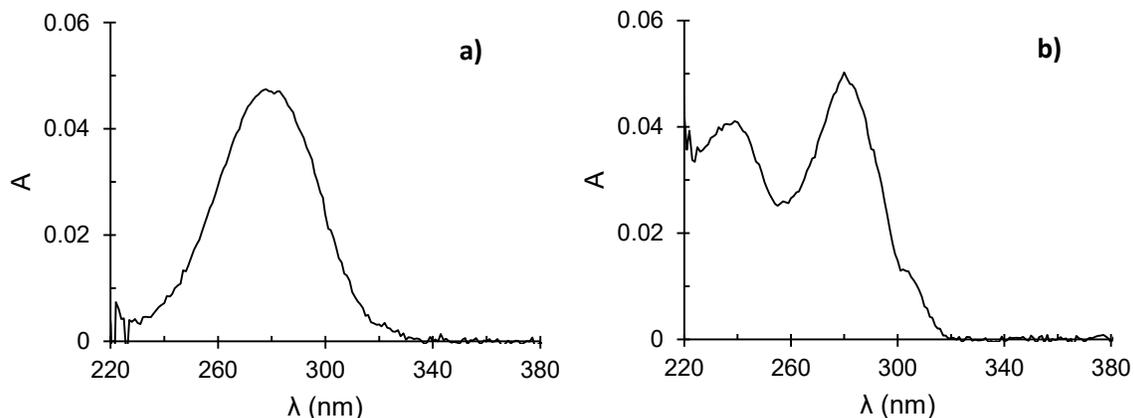


Figura 4.63. Espectros de absorbancia de los ligandos de la Casiopeína III-ia. a) acetilcetona $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ y b) 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl y 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Siguiendo la misma línea de estudiar cómo se modifican los espectros de absorción de las especies en estudio como función del medio acuoso en el que son disueltas, se trazaron los espectros de absorción de la Casiopeína III-ia en todo el intervalo del espectro electromagnético y disuelta en agua, una disolución 0.1 mol L^{-1} de KCl y en la disolución 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$.

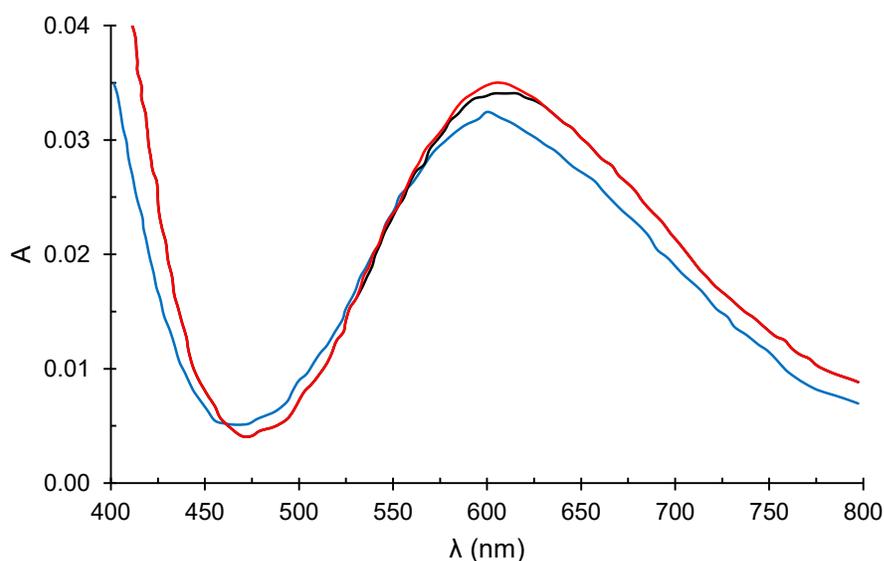


Figura 4.64. Espectros de absorción de la Casiopeína III-ia 0.5 mmol L^{-1} en agua (línea roja) y en 0.1 mol L^{-1} de KCl (línea negra) y en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ (línea azul), todos trazados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los espectros en la región del visible se muestran en la figura 4.64 en los cuales se observa que para la Casiopeína disuelta en agua y la disolución de KCl el espectro es prácticamente el mismo y el máximo en ambos espectros está en 607 nm. Cuando es disuelta en el medio que simula las condiciones fisiológicas el espectro se modifica un poco y el máximo de absorción se desplaza a los 601 nm. Lo que puede significar que la molécula de agua en posición apical en la Casiopeína probablemente ha sido sustituida por una molécula de Tris.

Para la región del ultravioleta los espectros se muestran en la figura 4.65 trazados a una concentración de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, pues como se verá más adelante el detector del espectro se satura a partir de los $125 \mu\text{mol L}^{-1}$, son muy similares entre sí. Los máximos en los tres disolventes se mantienen en 297 y 307 nm. Dando a entender que a estas concentraciones y en esta región la especie o las especies monitoreadas son las mismas en los tres medios. Las pequeñas diferencias observadas pueden ser debidas únicamente a que las concentraciones no son exactamente las mismas y como se verá más adelante el coeficiente de absorptividad molar en esta región es muy grande, por lo que un pequeño cambio en concentración provocará un gran cambio en absorbancia.

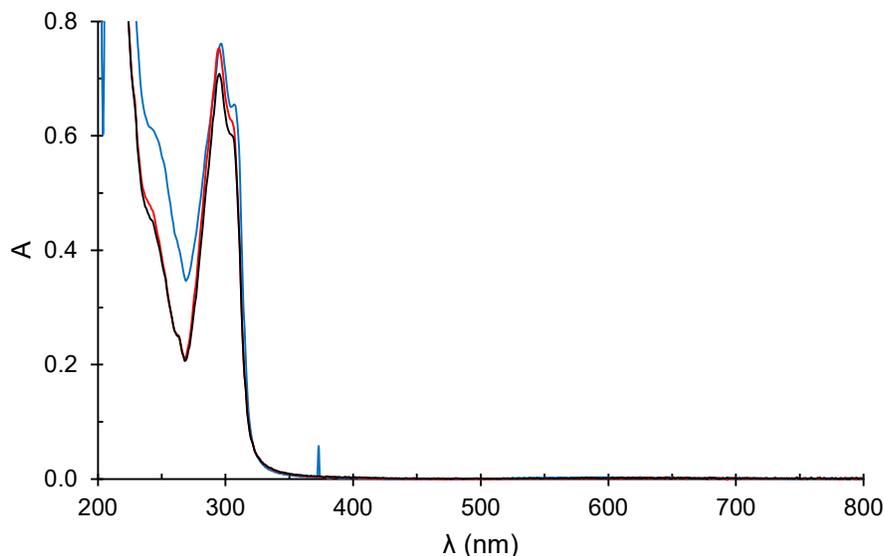


Figura 4.65. Espectros de absorción de la Casiopeína III-ia $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ en agua (línea roja) y en 0.1 mol L^{-1} de KCl (línea negra) y en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ (línea azul), todos trazados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

En la región del visible la Casiopeína III-ia presenta su máximo de absorción en 601 ± 0.4 nm y al menos a estas concentraciones este se mantiene constante, lo que indica que entre 0.05 y 0.5 mmol L⁻¹ la Casiopeína solo ha cambiado la molécula de agua en su estructura. En la figura 4.66 se muestran los espectros de la Casiopeína en la región del visible a las distintas concentraciones.

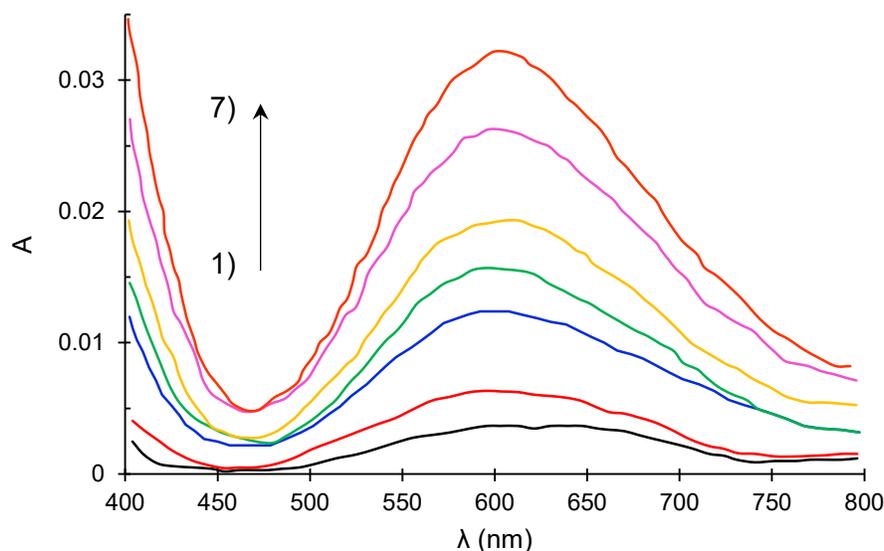


Figura 4.66. Espectros de absorción en la región del visible a distintas concentraciones de Casiopeína III-ia en el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y 25 °C. 1) 50, 2) 100, 3) 200, 4) 250, 5) 300, 6) 400 y 7) 500 μ mol L⁻¹.

La absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción se monitorea como una función de la concentración de Casiopeína. En la figura 4.67 se puede ver que para este sistema la gráfica tiene un comportamiento lineal de acuerdo con la ley de Lambert-Beer-Bouguer^[95]. La ecuación que describe esta línea recta es, $A_{601 \text{ nm}} = 63.82C_{\text{Casiopeína III-ia}} (\text{mol L}^{-1}) + 3.90 \times 10^{-5}$ ($r^2 = 0.9997$). Por lo tanto el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de esta Casiopeína III-ia en el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 en la región del visible es 63.82 ± 1.22 L mol⁻¹ cm⁻¹.

Por otro lado y como ya se vio anteriormente esta Casiopeína también presentan transiciones electrónicas en la región del ultravioleta y estas son diferentes a las que presentan los ligantes en disolución. La figura 4.68 muestra los espectros a las

distintas concentraciones estudiadas en esta región del espectro electromagnético en el medio acuoso que simula condiciones fisiológicas.

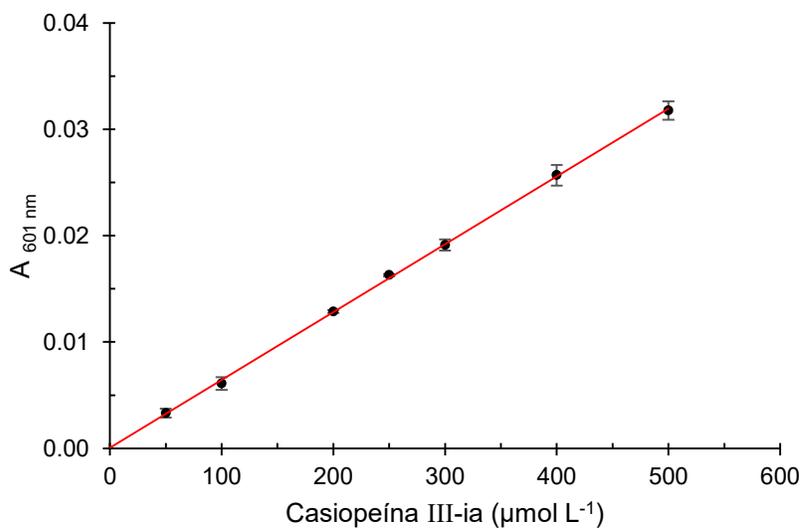


Figura 4.67. Absorbancia, 601 nm, como función de la concentración de la Casiopeína III-ia, en el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y 25 °C.

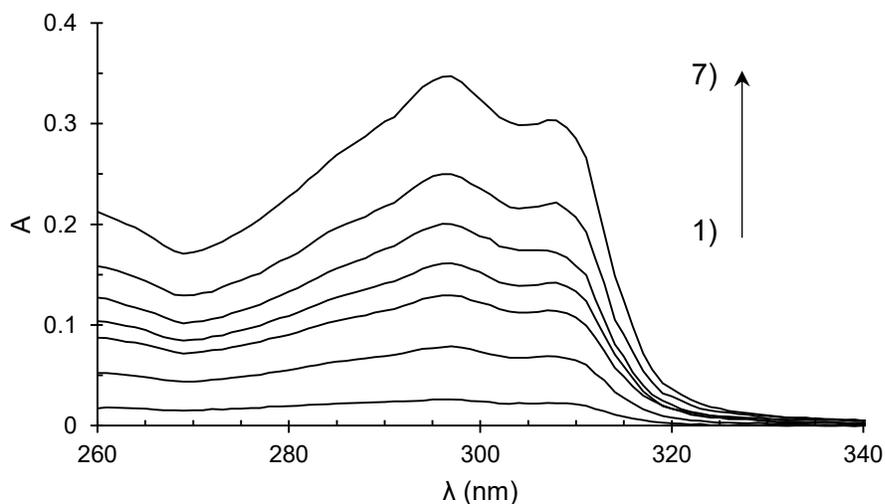


Figura 4.68. Espectros de absorción en la región del ultravioleta a distintas concentraciones de Casiopeína III-ia 1) 2.5, 2) 5, 3) 7.5, 4) 10, 5) 12.5, 6) 15 y 7) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en el medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y 25 °C.

Como se puede observar en la figura anterior la Casiopeína III-ia muestra dos máximos de absorción en la región del ultravioleta. El primero a $297 \pm 0.09 \text{ nm}$ y el

segundo a 307 ± 0.12 nm. Para poder determinar el coeficiente de absorptividad molar en el ultravioleta se siguieron los máximos de absorción como función de la concentración. En la figura 4.69 se puede ver que para ambos máximos de absorción esta grafica tiene también un comportamiento lineal de acuerdo con la ley de Lambert-Beer-Bouguer^[95]. Las ecuaciones que describen cada una de estas líneas rectas son, $A_{297 \text{ nm}} = 17,794.75 C_{\text{Casiopéina III-ia}}(\text{mol L}^{-1}) - 0.01 (r^2 = 0.9967)$ y $A_{307 \text{ nm}} = 15,541.61 C_{\text{Casiopéina III-ia}}(\text{mol L}^{-1}) - 0.01 (r^2 = 0.9958)$. Por lo tanto los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) de la Casiopeína en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ en la región del ultravioleta son de $17,784.75 \pm 102.11 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 297 nm y $15,541.61 \pm 53.64 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 307 nm . Los coeficientes de absorptividad molar en la región del ultravioleta tienen un valor mucho mayor que el calculado para la región del visible y presentan valores similares entre sí.

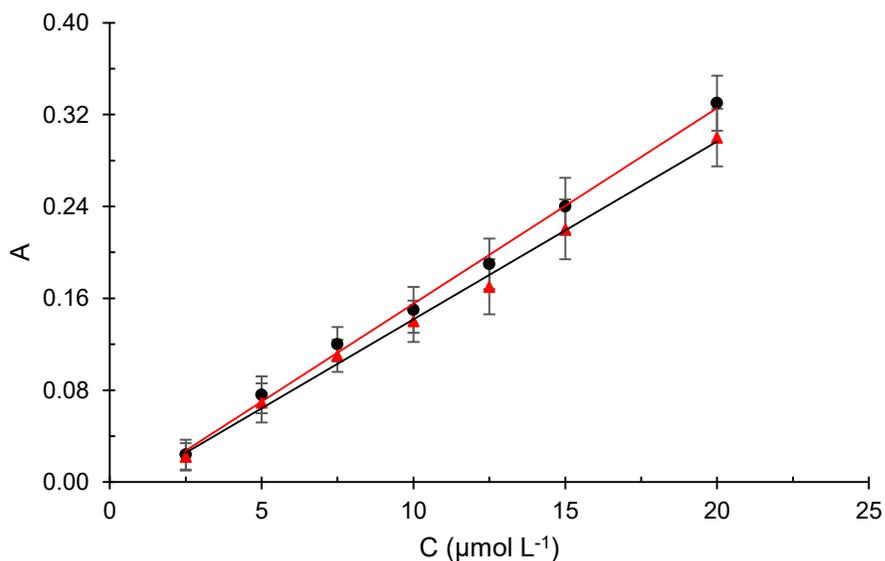


Figura 4.69. Absorbancia a 297 y 307 nm para la Casiopeína III-ia (círculos negros y triángulos rojos respectivamente), en medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para poder llevar a cabo el estudio de la interacción entre la proteína albúmina sérica humana y esta Casiopeína se debe tomar en cuenta que el estudio debe ser realizado en la región del ultravioleta puesto que la proteína tiene su máximo de

absorción en 278 nm y que esta señal se traslapará con las señales de la Casiopeína en esta zona. Además de que si se comparan los coeficientes de absorptividad molar en la región del ultravioleta de la Casiopeína III-ia estos son aproximadamente de la mitad del de la proteína. Esto tiene importancia para diseñar de manera correcta la relación de concentraciones presentes en una disolución donde la Casiopeína y la proteína formen parte del soluto y así obtener conclusiones sobre lo que esté pasando en esa disolución.

Siguiendo sobre la misma línea del diseño experimental para el estudio de la interacción de la albúmina con las Casiopeínas. En los experimentos para determinar los coeficientes de absorptividad molar de las Casiopeínas en la región del visible, donde se trabajó a concentraciones de entre 500 y 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$, se observó que después de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ los máximos de absorción en la región del ultravioleta saturan el detector del espectrofotómetro. Por lo que se realizó un experimento para determinar cuál es la concentración máxima de Casiopeína a la que se puede trabajar en una mezcla con proteína, sin que se sature el detector del equipo espectrofotométrico y que la relación de concentraciones sea la idónea para obtener información relevante. La figura 4.70 muestra el espectro de absorción de la Casiopeína III-ia en la región del ultravioleta a concentraciones por encima de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Las concentraciones en este experimento van desde los 25 y hasta los 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y como se puede observar el espectro en color rojo, que corresponde a 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$, comienza a saturar el detector del equipo y para el espectro en color azul a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ya está completamente saturado. Por lo tanto se decidió que la concentración máxima de Casiopeína III-ia con la que se puede trabajar en la región del ultravioleta es de 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (espectro en color verde). La principal razón de las concentraciones máximas con las que se puede trabajar en la región del ultravioleta obedece a los valores de los coeficientes de absorptividad molar que presenta esta Casiopeína en el medio de estudio.

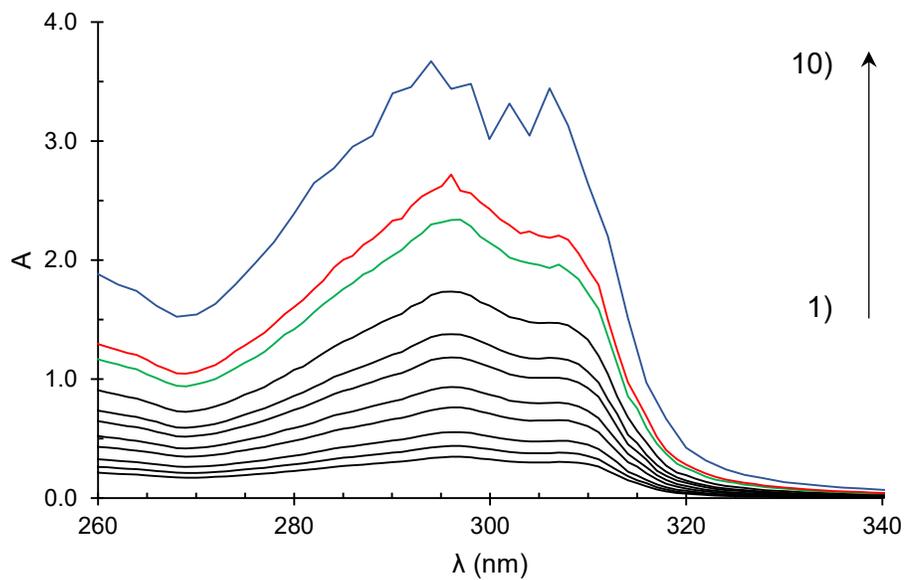


Figura 4.70. Espectros de absorción en la región del ultravioleta a distintas concentraciones de Casiopeína III-ia en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a $\text{pH} = 7.4$ y 25°C . 1) 25, 2) 30, 3) 40, 4) 50, 5) 60, 6) 70, 7) 90, 8) 110, 9) 125 y 10) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para estudiar la interacción del Cu(II) y la Casiopeína III-ia mediante espectrofotometría ultravioleta y visible se realizó un experimento siguiendo como se modifica el espectro como función de la concentración de Cu(II) y Casiopeína III-ia de la albúmina sérica humana. Los resultados se muestran en las figuras 4.71 y 4.72. Para el sistema ASH/Cu(II) primero se debe recordar que el máximo de absorción para el Cu(II) en este medio acuso está en 267 nm (cercano al de la ASH) y el coeficiente de absorción molar es $3019 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (alrededor de 12.4 veces menos que para la ASH). Por lo que si se observa la siguiente figura se puede ver que no existe ningún cambio en la posición del máximo de absorción y el efecto en el aumento de la absorbancia (figura 4.71 a) para cada concentración de Cu(II) en disolución, que podría pensarse como un efecto hipercrómico, es simplemente por el perfil del Cu(II) sumado con el perfil de la albúmina sérica humana.

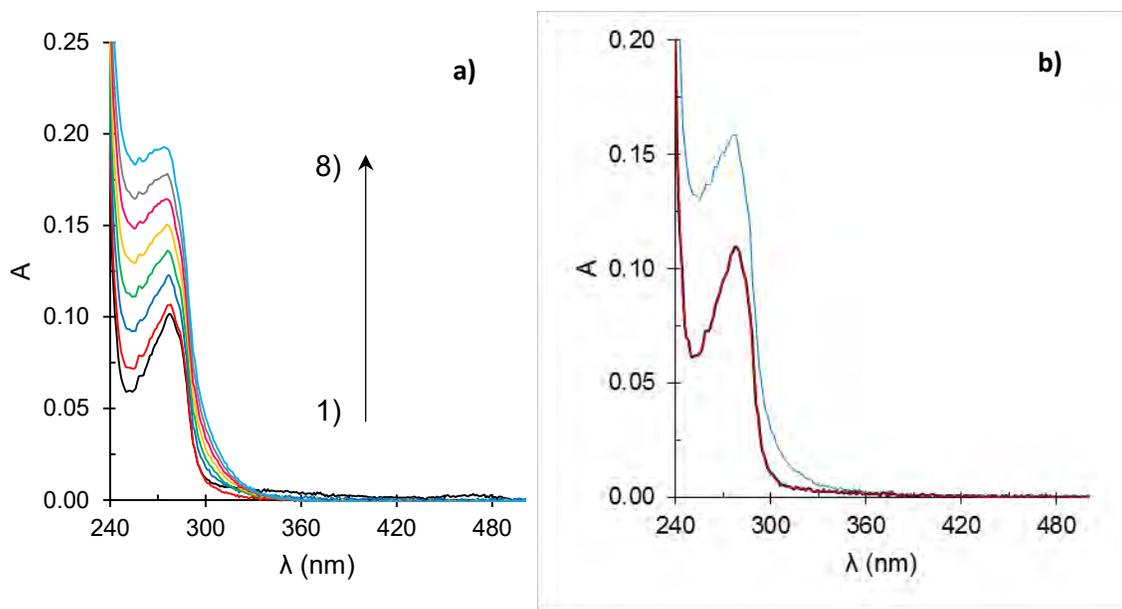


Figura 4.71. a) Espectros de absorción 1) 2.70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de la albúmina sérica humana en presencia de Cu(II) a diferentes concentraciones 2) 4.99, 3) 10.94, 4) 20.78 5) 30.51, 6) 42.10 7) 50.68 y 8) 62.95 $\mu\text{mol L}^{-1}$ b) Espectros de la ASH a 2.94 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (rojo), de la mezcla de la proteína 2.94 $\mu\text{mol L}^{-1}$ más 41.61 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) (azul) y la resta del espectro de cobre y la mezcla (negro). Todos en 0.1 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ de KCl a pH = 7.4 y 25 °C.

Puesto que cuando el espectro de absorción del Cu(II) es restado al de la mezcla únicamente se reproduce una y otra vez el de la proteína libre como se observa en la figura 4.71 b). Donde se muestra el ejemplo del espectro de la ASH a 2.94 $\mu\text{mol L}^{-1}$, la mezcla de la proteína a esta misma concentración más 41.61 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) y la resta del espectro de cobre y la mezcla. Obteniendo en la resta una reproducción exacta del espectro de la proteína libre. Los resultados de la figura anterior dicen que la interacción de la ASH con el Cu(II) no modifica alguno de los espectros de absorción en estas condiciones. En el caso de la mezcla Casiopeína albúmina se observa un resultado exactamente igual. Lo que se observa en la figura 4.72 a) se muestra la mezcla de una disolución de ASH más concentraciones variables de Casiopeína III-ia y en la 4.72 b) la resta de cada espectro de absorción a cada una de las concentraciones de Casiopeína y donde una vez más se reproduce una y otra vez el espectro de la ASH libre con ruido. Puesto que los coeficientes de absorptividad molar de la Casiopeína además de tener máximos de absorción muy cercanos al de la ASH son apenas un poco menos de la mitad de esta haciendo aún más complicado el análisis.

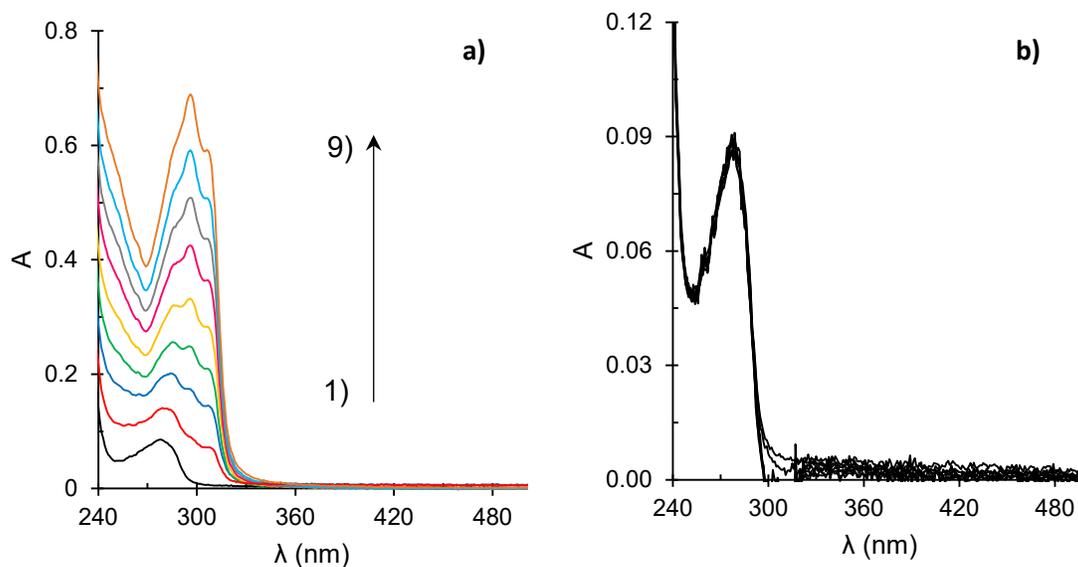


Figura 4.72. a) Espectros de absorción 1) $2.51 \mu\text{mol L}^{-1}$ de la albúmina sérica humana en presencia de Casiopeína III-ia a diferentes concentraciones 2) 4.99, 3) 9.96, 4) 14.93 5) 19.94, 6) 24.89 7) 30.06 8) 34.97 y 9) $40.04 \mu\text{mol L}^{-1}$ b) resta del espectro de absorción de la Casiopeína III-ia a cada concentraciones de la mezcla en a). Todos en 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl a pH = 7.4 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por lo que a pesar de que en la literatura se reportan análisis de datos de espectrofotometría de ultravioleta y visible de interacción entre compuestos de coordinación de Co(III), Mn(II) y Zn(II) con la albúmina humana, estos no muestran el espectro de su compuestos de coordinación libre, donde está su máximo de absorción y el valor del coeficiente de absortividad molar de éste. En estos trabajos se menciona que no existe un efecto de cambio en el máximo de absorción de la proteína, pero si un efecto hiperocrómico algo que no se observó para los sistemas estudiados en este trabajo^[125 – 127].

Observado lo anterior se realizó un experimento siguiendo el espectro combinado del Cu(II) y de la Casiopeína III-ia con la albúmina sérica humana como función del tiempo. Bajo la premisa de que el no observar una modificación en el espectro de absorción de la proteína al estar en un medio con alguno de los compuestos de cobre es a causa de la necesidad de un tiempo de incubación de las disoluciones. Algo que no se observó mediante los experimentos de voltamperometría diferencial

de pulsos, donde los voltamperogramas de la mezcla se veían afectados solo con el tiempo que tomó la preparación y homogeneización.

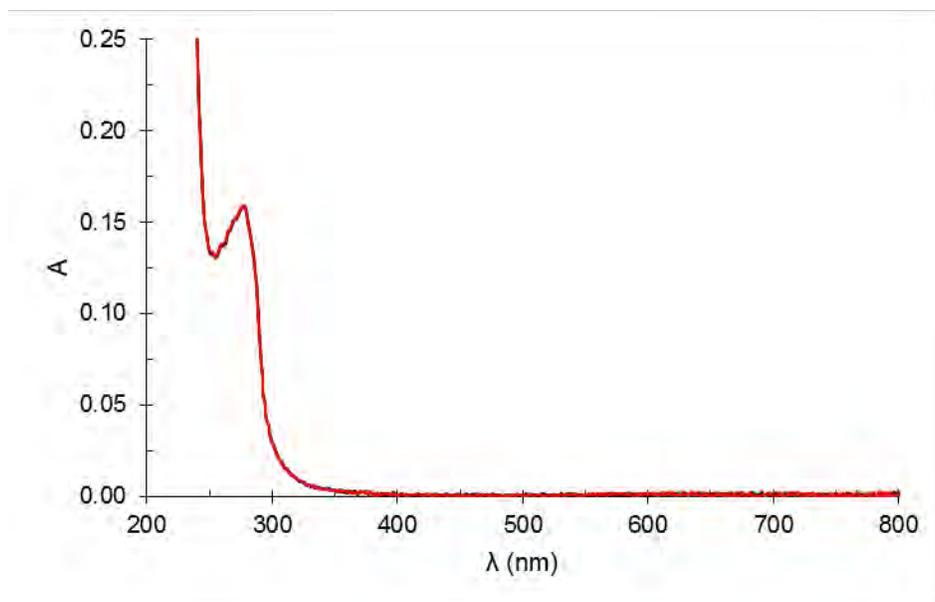


Figura 4.73. Espectros de absorción de $3.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH más $30.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) seguido desde la preparación de la disolución y hasta 120 minutos después, en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl 0.1 a $\text{pH} = 7.4$ y 25°C .

Por lo que estos experimentos se siguieron desde que se preparó la disolución hasta 120 minutos después. Durante los primeros 30 minutos se trazaron espectros cada 5 minutos y después solo cada 30 minutos a relaciones de concentración de 1:2, 1:5 y 1:10. En las figuras 4.73 y 4.74 se muestran los resultados solamente para la relación de concentraciones ASH Cu(II) y Casiopeína 1:10. Esto porque se observó que no existe modificación del espectro para ninguna relación de concentración como función del tiempo, como se puede ver en las figuras siguientes donde los espectros se superponen. Es decir el tiempo de incubación no es un factor para observar o no una modificación en el espectro de absorción de la proteína albúmina sérica humana en presencia de Cu(II) y Casiopeína III-ia.

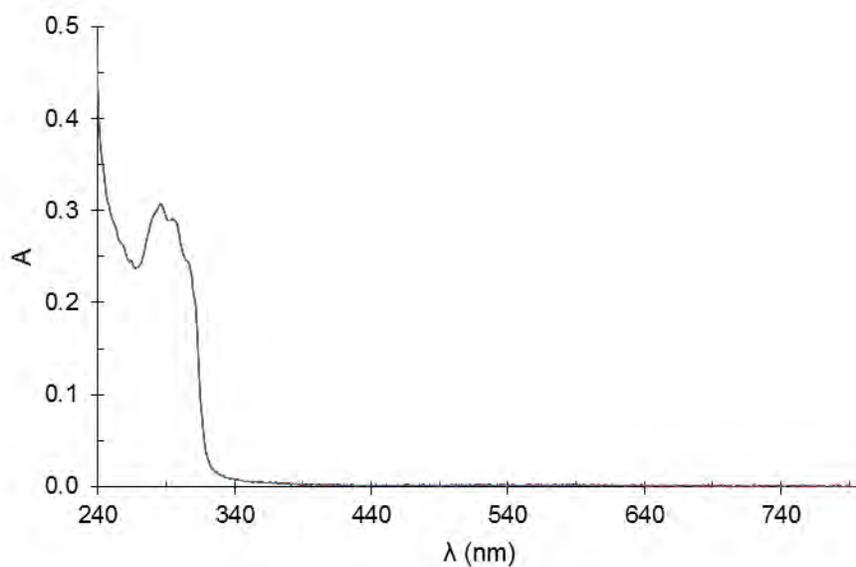


Figura 4.74. Espectros de absorción de $2.97 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ASH más $29.58 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Casiopeína III-ia seguido desde la preparación de la disolución y hasta 120 minutos después, en el medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} de Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} de KCl 0.1 a $\text{pH} = 7.4$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Capítulo 5

Conclusiones y expectativas

5.1 Conclusiones

Se logró estudiar de manera independiente al Cu(II), la Casiopeína III-ia y la proteína albúmina sérica humana en un medio acuoso a pH = 7.4 que simula condiciones fisiológicas. Esto se alcanzó mediante el uso de la electroquímica, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido y espectrofotometría ultravioleta y visible. Con ello se determinó el comportamiento electroquímico, el calor de dilución, las transiciones térmicas, los perfiles espectrofotométricos y los coeficientes de absortividad molar de cada especie. También se consiguió hacer un acercamiento a la interacción Cu(II)-ASH y Casiopeína-ASH, empleado las mismas técnicas experimentales. Estos experimentos proporcionaron evidencia de que sí existe una interacción entre las especies. De los resultados de voltamperometría cíclica se observó que la interacción del Cu(II) con la albúmina es una interacción fuerte y específica, cómo se ha reportado ya por la formación de enlaces de coordinación del Cu(II) con algunos residuos de aminoácidos de la ASH. Mientras que la interacción de la Casiopeína III-ia con esta proteína es de tipo hidrofóbica/hidrofílica. Demostrando que es una técnica suficientemente buena para diferenciar entre cada tipo de interacción. Los experimentos de voltamperometría diferencial de pulsos mostraron que las especies Cu(II)-ASH y Casiopeína-ASH formadas en disolución son no electroactivas y que se forman con una estequiometría 1:1 y 2:1 respectivamente. De los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica se observó, una vez más, que la estequiometría de unión Cu(II)-ASH es de 1:1 y que la reacción es termodinámicamente exotérmica y espontánea. Para el caso de la Casiopeína III-ia se logró observar que sí existe una interacción de ésta con la albúmina generando una entalpía constante y exotérmica. De los experimentos de calorimetría diferencial de barrido se comprobó que la interacción de estas especies de cobre estudiadas al interactuar con la ASH tienen un efecto en su estructura terciaria disminuyendo la energía necesaria para hacer pasar a la proteína de su estado nativo a desplegado por efecto de la temperatura. La técnica de espectrofotometría ultravioleta y visible fue la única técnica con la que no se pudo comprobar la

interacción de las moléculas estudiadas puesto que los espectros de absorción tanto de la albúmina como del Cu(II) y Casiopeína III-ia no se vieron modificados.

5.2 Expectativas

Este trabajo ha generado nuevas interrogantes que es imperativo responder. La interacción entre fármacos y macromoléculas, como proteínas y ADN, es un área de gran importancia para entender el funcionamiento a nivel molecular, su transporte y liberación en el cuerpo humano, la unión a dianas biológicas específicas y que efecto tiene el fármaco sobre estas. Porque así se pueden diseñar de mejor manera nuevos medicamentos y evitar, por ejemplo, efectos secundarios. En el caso de los metalofármacos que son una opción al tratamiento de enfermedades desde ya hace tiempo, se deben tener especiales consideraciones para los estudios de interacción de estos con moléculas biológicas en medios fisiológicos debido a su baja solubilidad, capacidad de acidificar el medio y a la posibilidad de que formen nuevos compuestos de coordinación con los iones que amortiguan el medio. Por lo que se considera necesario hacer estudios en diversos medios que simulen las condiciones fisiológicas, hacer uso de un conjunto variado de técnicas experimentales e incluso recurrir a realizar un estudio de la interacción del núcleo metálico con la diana biológica. Puesto que la manera en la que se forman especies (por ejemplo) metal/proteína es a través de enlaces de coordinación entre algunos residuos de aminoácidos en la proteína con el catión metálico. A diferencia de un compuesto de coordinación que se encuentra, ya, formando enlaces de coordinación con los ligantes con los que fue sintetizado. Existen entonces varias posibilidades para formar especies compuesto de coordinación/proteína las cuales pueden ser: intercalación, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas/hidrofílicas e incluso desprenderse de uno, o varios ligantes, para formar nuevos enlaces con los aminoácidos de la proteína. Estos dependerán de la magnitud de las constantes de formación y la consecuencia de esto podría ocasionar, o no, la pérdida de la actividad biológica del compuesto original.

Capítulo 6
Referencias

1. de Anda-Jáuregui G., Espinal-Enríquez J. H., Alcalá-Corona S. A., Ruiz-Azuara L., Hernández-Lemus E. **2018**. Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach. *bioRxiv*. Preimpresión: 10.1101/327718.
2. Silva-Platas C. Villegas A. C, Oropeza-Almazán Y., Carranca M., Torres-Quintanilla A., Lozano O., Valero-Elizondo J., Castillo E., Bernal-Ramírez J., Fernández-Sada E. Vega F. L., Treviño-Saldaña N., Chapoy-Villanueva H., Ruiz-Azuara L., Hernández-Brenes C., Elizondo-Montemayor L., Guerrero-Beltrán C. E., Carvajal K., Bravo-Gómez M. E. García-Rivas G. **2018**. Ex Vivo Cardiotoxicity of Antineoplastic Casiopeinas Is mediated through energetic dysfunction and triggered mitochondrial-dependent apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1 – 13.
3. Tardito S., Marchió L. **2009**. Copper complexes as anticancer strategies. *Curr. Med. Chem.* 16, 1325 – 1348.
4. Bravo-Gómez M. E., Ruiz-Azuara L. **2010**. Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 3606 – 3615.
5. García Ramos J. C. **2007**. Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Ruiz-Azuara L. **1992**. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. US Patent No. 5, 107, 005.
7. Ruiz-Azuara L. **1996**. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from methylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. US Patent No.5, 576, 326.
8. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Muller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G. E., Kelland R. L., Orr R. M., Dobrota M. **2000**. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L120 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. In Vitro.* 14, 1 – 5.

9. Marín-Hernández A., Gracia-Mora I., Ruíz-Ramírez L., Moreno-Sánchez R. **2003**. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1979 - 1989.
10. Aust S. D., Morehouse L., Thomas C. E. **1985**. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol. Med.* 1, 3 – 25.
11. Halliwell B., Gutteridge J. M. **1990**. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1 – 85.
12. Becco L., García-Ramos J. C. Ruiz-Azuara L., Gambino D., Garat B. **2014** Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series. *Biol. Trace. Elem. Res.* 161, 210 - 215.
13. Bravo-Gómez M. E., Campero-Peredo C., García-Conde D., Mosqueira-Santillán M. J., Serment-Guerrero J., Ruiz-Azuara L. **2015**. DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeínas®) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron.* 102, 530 – 538.
14. Hambley T. W. **2007**. Metal-based therapeutics. *Science.* 318, 1392 – 1393.
15. Zhang C. X., Lippard S. J. **2003**. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 481 – 489.
16. Hadjikakou S. K., Hadjiliadis N. **2009**. Antiproliferative and anti-tumor activity organotin compounds. *Coord. Chem. Rev.* 253, 235 – 249.
17. Dubler E., Buschmann R., Schmalte H. W. **2003**. Isomer abundance of bis(β -diketonato) complexes of titanium(IV). Crystal structures of the antitumor compound budotitane $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\text{bzac})_2(\text{OEt})_2]$ and of its dichloro-derivative $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\text{bzac})_2\text{Cl}_2]$ (bzac=1-phenylbutane-1,3-dionate). *J. Inorg. Biochem.* 95, 97 – 104.
18. Gómez-Ruiz S., Kaluderovic G. N., Prashar S., Polo-Cerón D., Fajardo M., Zizak Z., Sabo T. J., Juranic Z. D. **2008**. Cytotoxic studies of substituted titanocene and *ansa*-titanocene anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.* 102, 1558 – 1570.

19. Tshuva E. Y., Peri D. **2009**. Modern cytotoxic titanium (IV) complexes: Insights on the enigmatic involment of hydrolysis. *Coord. Chem. Rev.* 253, 2098 – 2115.
20. McKeage M. J., Maharaj M. J., Berners-Price S. J. **2002**. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. *Coord. Chem. Rev.* 232, 127 – 135.
21. Bindoli A., Rigobello M. P., Scutari G., Gabbiani C., Casini A., Messori L. **2009**. Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* 253, 1692 – 1707.
22. Jakupec M. A., Galanski M., Arion V. D., Hartinger C. G. **2008**. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *B. K. Keppler, Dalton Trans.* 183 – 194.
23. Serli B., Zangrando E, Gianferrara T., Yellowlees L., Alessio E. **2003**. Coordination and release of NO by ruthenium–dimethylsulfoxide complexes—implications for antimetastases activity. *Coord. Chem. Rev.* 245, 73 – 83.
24. Bergamo A., Sava G. **2011**. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans.* 40, 7817 – 7823.
25. Habtemariam A., Watchman B., Potter B. S., Palmer R., Parsons S., Parkin A., Sadler P. J. **2001**. Control of aminophosphine chelate ring-opening in Pt(II) and Pd(II) complexes: potential dual-mode anticancer agents. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1306 – 1318.
26. Garoufis A., Hadjikakou S. K., Hadjiliadis N. **2009**. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coord. Chem. Rev.* 253, 1384 - 1397.
27. Harlos M., Ott I., Gust R., Alborzinia H., Wçlfl S., Kromm A., Sheldrick W. S. **2008**. Synthesis, biological activity, and structure–activity relationships for potent cytotoxic rhodium(III) polypyridyl complexes. *J. Med. Chem.* 51, 3924 – 3933.
28. Marzano C., Pellei M., Tisato F., Santini P. **2008**. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 9, 185 – 211.

29. García-Ramos J. C., Galindo-Murillo R., Tovar-Tovar A., Alonso-Saenz L., Gómez-Vidales A., Flores-Álamo M., Ortiz-Frade L., Cortes-Guzmán F., Moreno-Esparza R., Campero A., Ruiz-Azuara L. **2014**. The π -back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu^{II} antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study. *Chem. Eur. J.* 20, 13730 – 13741.
30. Tovar-Tovar A., Ruíz-Azuara L., Campero-Celis A., Romerosa A., Moreno-Esparza R., Rosales-Hoz M. J. **2004**. Structural and reactivity studies on 4-4'-dimethyl-2, 2'-bipyridine acetylacetonate copper (II) nitrate (casiopeina II-ia) with methionine, by UV-vis and EPR techniques. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1045 - 1053.
31. Gasque L., Medina G., Moreno-Esparza R., Ruíz-Ramírez L. **1998**. Cu-O stretchig frequency correlation whit phenantroline pK_a values in mixed copper complexes. *Inorg. Chim. Acta.* 288, 106 - 111.
32. Gasque L., Medina G., Moreno-Esparza R., Ruíz-Ramírez L. **1992**. Stability of ternary copper and nickel complexes with 1, 10-phenantroline. *J. of Biochem.* 48, 121 - 127.
33. Martinez A., Salcedo R., Sansores L. E. **2001**. A density functional study of the reactivity and stability of mixed copper complexes. Is hardness the reason? *Inorg. Chem.* 40, 301 - 306.
34. Avelar M., Martínez A. **2012**. Do Casiopeinas® prevent cancer disease by acting as antiradicals? A chemical reactivity study applying density functional theory. *J. Mex. Chem. Soc.* 56 (3), 250 - 256.
35. Serment-Guerrero J., Bravo-Gomez M. E., Lara-Rivera E., Ruiz-Azuara L., **2017** Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: clues about their mechanisms of action. *J. Inorg. Biochem.* 166, 68 – 75.
36. Gracia-Mora I., Ruíz-Ramírez L., Gómez-Ruiz C., Tinoco-Méndez M., Márquez-Quiñones A., Romero-De Lira L., Marín-Hernández A., Macias-Rosales L., Bravo-Gómez M. E. **2001**. Knight's move in periodic table from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panels. *Met.-Based Drugs.* 8 (1), 19 - 28.

37. Mejía C., Ruiz-Azuara L. **2008**. Casiopeínas IIgly and IIIa induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol. Oncol. Res.* 14, 467 - 472.
38. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Muller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G. E., Kelland R. L., Orr R. M., Dobrota M. **2000**. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L120 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. In Vitro.* 14, 1 – 5.
39. Trejo-Solís C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez-Ropón A., Osorio-Rico L., Luvia S. T., Gracia-Mora I., Márquez-Rosado L., Sánchez A., Moreno-García M. E., Cruz A., Bravo-Gómez M. E., Ruiz-Ramírez L., Rodríguez-Enríquez S., Sotelo J. **2005**. Cas II-gly Induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia.* 7, 563 – 574.
40. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramírez L., Howard J.A., Debrotta M. **2003**. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II. *Toxicology.* 194, 103 - 113.
41. Alemn-Medina R., Muñoz-Sánchez J. L., Ruiz-Azuara L., Gracia-Mora I. **2008**. Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to hela cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicol. In Vitro.* 22, 710 – 715.
42. García-Ramos J. C., Grizett Gutiérrez A., Vázquez-Aguirre A., Toledano-Magaña Y., Alonso-Sáenz A. L., Gómez-Vidales V., Flores-Alamo M., Mejía C., Ruiz-Azuara L. **2016**. The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *BioMetals.* 30 (1), 43 – 58.
43. Reyes L., Fuentes-Noriega I., Ruiz-Ramírez L., Macías L. **2003**. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína II-gly in rat plasma. *J. Chromatogr. B.* 791, 111 - 116.

44. Fuentes-Noriega I., Ruíz-Ramírez L., Tovar-Tovar A., Rico-Morales H., Gracia-Mora I. **2002**. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína III in rat plasma. *J. Chromatogr. B.* 772, 115 - 121.
45. Correia I., Borovica S., Cavaco I., Matos C. P., Roy S., Santos H. M., Fernandes L., Capelo J. L., Ruiz-Azuara L., Costa Pessoa J. **2017**. Evaluation of the binding of four anti-tumor Casiopeínas® to human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* 175, 284 – 297.
46. Valencia-Cruz A. I., Uribe-Figueroa L. I., Galindo-Murillo R., Baca-López K., Gutiérrez A. G., Vázquez-Aguirre A., Ruiz-Azuara L.; Hernández-Lemus E., Mejía C. **2013**. Whole genome gene expression analysis reveals Casiopeína-induced apoptosis pathways. *PLoS ONE.* 8, e54664.
47. Carter D. C., Ho J. X. **1994**. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, 153 – 203.
48. He X., Carter D. C. **1992** Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* 358, 209 – 215.
49. Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi. **2005**. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life.* 57(12), 787 – 796.
50. Morell A.G., Scheinberg L.H. **1958**. Preparation of an apoprotein from ceruloplasmin by reversible dissociation of copper. *Science* 127, 588 – 590.
51. Markowitz H., Gubler C.J., Mahoney C.P., Cartwright G.E., Wintrobe M.M. **1955**. Studies on copper metabolism. XIV. copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 34(10), 1498 – 1508.
52. Beckman J.S., Carson M., Smith C.D., Koppenol W.H. ALS, SOD and peroxynitrite **1993**. *Nature.* 364, 584.

53. Multhaup G., Schlicksupp A., Hesse L., Ruppert T., Masters L.C., Beyreuther K. **1996**. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science*. 271, 1406 – 1409.
54. Wirth P.L., Linder M.C., Natl J. **1985**. Distribution of copper among components of human serum. *Cancer Inst.* 75, 277 – 284.
55. Gordon D.T., Leinart A.S., Cousins J.R. **1987**. Portal copper transport in rats by albumin. *Am. J. Physiol.* 252, E327 – 333.
56. Sadler P.J., Tucker A., Viles J.H. **1994**. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. *Eur. J. Biochem.* 220, 193 – 200.
57. Laussac J.P., Sarkar B. **1984**. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 23, 2832 – 2838.
58. Muller D., Reverend B. D.-L., Sarkar B. **1984**. Studies of copper(II) binding to glycyglycyl-L-Tyrosine-N-methyl amide, a peptide mimicking the NH₂-terminal copper(II)-binding site of dog serum albumin by analytical potentiometry, spectrophotometry, CD, and NMR spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* 21, 215 – 226.
59. Sun W., Han. J, Jiao K., Lu L. **2006**. Studies on the interaction of protein with acid chrome blue K by electrochemical method and its analytical application. *Bioelectrochemistry*. 68, 60 – 66.
60. Temerk Y., Ibrahim M., Ibrahim H., Kotb M. **2016**. Interactions of an anticancer drug lomustine with single and double stranded DNA at physiological conditions analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *J. Electroanal. Chem.* 769, 62 – 71.
61. Allen J. B., Foulken R. L. **2000**. Electrochemical methods Fundamentals and applications. 2a. U.S.A. Wiley.

62. Sayer D., Heineman W., Beebe J. **1984**. Chemistry Experiments for Instrumental Methods. U.S.A.: John Wiley & Sons Inc.
63. Evans D.H., O'Connell K.M., Petersen R.A., Kelly M.J. **1983**. Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* 60 (4), 290 – 292.
64. De Mars R.D., Shain. **1958**. Voltammetry with linearly varying potential: case of irreversible waves at spherical electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 81 (11), 2654 – 2659.
65. Nicholson R., Shain I. **1964**. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.* 36, 706 – 723.
66. Nicholson R., Shain I. **1965**. Theory of Stationary electrode Polarography for a Chemical Reaction Coupled between Two Charge Transfers. *Anal. Chem.* 37, 178 – 190.
67. Lavagnini I., Antiochia R., Magno F. **2003**. An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data. *Electroanalysis.* 16, 505 – 506.
68. Matsuda H., Ayabe Y. **1955**. The theory of the cathode-ray polarography of Randles-Sevcik, *Zeitschrift fuer Elektrochemie and Angewandte Physikalische Chemie.* 59, 494 – 503.
69. Bott A. W., Heineman R. W. **2004**. Chronocoulometry. *Curr. Sep.* 20 (4), 121 – 126.
70. Anson C. F. **1983**. Chronocoulometry. A convenient, rapid and reliable technique for detection and determination of adsorbed reactants. *J. Chem. Educ.* 60 (4), 293 – 296.
71. Pelzer J., Scholz F., Henrion G., Nitschke L. **1989**. Optimization of parameters for differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. *Electroanalysis.* 1, 437 – 440.

72. García Mendoza A. **2011**. Estudio electroanalítico de ferroceno y p-benzoquinona bajo la influencia del nivel de acidez en cinco líquidos iónicos. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
73. Peña Cruz L. **2015**. Determinación electroquímica de la cantidad de agua en líquidos iónicos tipo imidazolio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
74. Marines Navarrete O. A. **2015**. Aporte analítico al conocimiento del comportamiento químico de inhibidores usuales de la enzima convertidora de angiotensina I: captropil y lisinopril. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
75. Brown A. P., Anson F. C. **1977**. Cyclic and differential pulse voltammetric behavior of reactants confined to the electrode surface. *Anal. Chem.* 49 (11), 1589 – 1595.
76. Mayén-Mondragon R., Baeza A., Ibañez G. J. **2002**. Simultaneous determination of nickel and cadmium by differential pulse polarography. *Anal. Sci.* 18, 191 – 193.
77. Bard. A., Stratmann M., Unwin P. **2003**. Encyclopedia of electrochemistry. Volume 3: Instrumentation and electroanalytical chemistry. U.S.A. Wiley. 113 – 115.
78. van Leeuwen H. P., Buffle J., Lovric M. **1992**. Reactant adsorption in analytical pulse voltammetry: methodology and recommendations. *Pure Appl. Chem.* 64, 1015 – 1028.
79. Brett C. M. A., Oliveira Brett A. M., Serrano S. H. P. **1994**. On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 366, 225 – 231.
80. Macdonald D.D. **2006**. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta.* 51, 1376 – 1388.
81. Lvovich V. F. **2012**. Impedance spectroscopy: applications to electrochemical and dielectric phenomena. U.S.A. John Wiley & Sons. 1 – 6.

82. Laidler K. J. **1993**. The world of physical chemistry. Oxford University Press, New York. 538.
83. Ladbury J. E., Chowdhry B. Z. **1996**. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular. *Chem. Biol.* 3 (10), 791 - 801.
84. Ropers M. H., Czichocki G., Brezesinski G. **2003**. Counterion effect on the thermodynamics of micellization of alkyl sulfates. *J. Phys. Chem. B* 107 (22), 5281 – 5288.
85. Torchilin P. V., Weissig V. **2003**. Liposomes, second edition. U.K. Oxford University Press. Chapter 13, 337 - 340.
86. Freyer M. W., Lewis E. A. **2008**. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Method cell biol.* 84, 79 – 113.
87. Freire E., Mayorga O. L., Straume M. **1990**. Isothermal calorimetry. *Anal. Chem.* 62, 950A - 959A.
88. Haiyan F. **2004**. Protein-protein interactions. Methods in molecular biology Vol. 261. Humana press. Part II IN VITRO TECHNIQUES. Velazquez-Campoy Adrian, Leavitt A. Stephanie, Freire E. Characterization of protein–protein interactions by isothermal titration calorimetry. 35 - 54.
89. Condado Morales I. **2013**. Determinación de las microconstantes de velocidad para la hidrólisis de la *L*-lisina-*p*-nitroanilida catalizada por tripsina de *Bos taurus*, mediante calorimetría de titulación isotérmica. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
90. Jalesarov I., Bosshard H. **1999**. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 12, 3 – 18.
- 91 Gutiérrez Quezada A. **2017**. Estudio de la estabilidad cinética y flexibilidad térmica de proteínas usando como modelo las trifosfato isomerasas de dos

protozoarios cercanos en la evolución. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

92. Rösgen J., Hinz H. **1999**. Theory and practice of DSC measurements on proteins. Handbook of thermal analysis and calorimetry vol. 4, R. B. Kemp, Ed. Elsevier Amsterdam, New York. 63 – 108.

93. Jaffé H. H., Orchin M. **1962**. Theory and application of UV spectroscopy. Wiley. New York. 83 – 90.

94. Yadav L.S.D. **2005**. Organic spectroscopy. Springer-Science Bussines Media, B.V. Allahabad, India. 7 - 10.

95. Harris D. **2001**. Análisis cuantitativo 2nd ed. España. Reverté. 499 - 505.

96. Lohman F. H. **1955**. The matematical combination of Lambert's law and Beer's law. *J. Chem. Edu.* 32 (3), 155.

97. Baeza A. **2006**. Química analítica. Expresión gráfica de las reacciones químicas. Reacciones en disolución y en las interfases en condiciones de amortiguamiento simple. 57 – 58.

98. Milazzo G., Caroli S., Sharma V. K. **1978**. Tables of Standard Electrode Potentials. London: Wiley. 89.

99. Kotrlý S., Susha L. **1985**. Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry. John & Wiley. 428.

100. Ringbom A. **1963**. Complexation in Analytical Chemistry. Wiley-Interscience, New York. 347.

101. Gomori G. **1955**. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol.* 1, 138 - 146.

102. Fischer B. E.; Haring U. K., Tribolet R., Sigel H. **1979**. Stability of Binary and Ternary Complexes Containing 2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris) and Adenosine 5'-Triphosphate (ATP). *Eur. J. Biochem.* 94, 523 – 530.

103. Bai K. S.; Martell A. **1969**. The interaction of 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol with copper(II) and nickel(II) ions. *E. J. Inorg. Nucl. Chem.* 31, 1697 – 1707.
104. Bologni L., Sabatini A., Vacca A. **1983**. Complex formation equilibria between 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3,-propanediol (tris, tham) and nickel(II), copper(II), zinc(II) and hydrogen ions in aqueous solutions *Inorg. Chim. Acta.* 69, 71 – 75.
105. Canepari S., Carunchio V., Schina R. **1999**. Complex formation between copper(II) and several β -amino alcohols in aqueous solution: a potentiometric and spectrophotometric study. *Polyhedron.* 18, 3263 – 3267.
106. Baeza A. **2015**. Documento de Apoyo (III.RQ16): Capacidad Amortiguadora. [En línea, 16/02/2018]. <http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/05/BC-Van-Slyke-2015-1.pdf>.
107. Austrilino L., Nascimento O. R., Castellano E. E., Tabak M. **1968**. On the interaction of copper with tris(hydroxymethyl)aminomethane. *Can. J. Chem.* 821 – 826.
108. Wells M. A., Jelinska C., Hosszu L. P. L., Craven C. J. Clarke A. R., Collinge J., Waltho J. P., Jackson G. S. **2006**. Multiple forms of copper (II) co-ordination occur throughout the disordered N-terminal region of the prion protein at pH 7.4. *Biochem. J.* 400, 501 – 510.
109. Brignac P. J., Mo C. **1975**. Formation constants and metal-to-ligand ratios for tris(hydroxymethyl)aminomethane-metal complexes. *Anal. Chem.* 47 (8), 1465 – 1466.
110. Masi D., Mealli C., Sabat M., Sabatini A., Vacca A., Zanolini F. **1984**. Bonding capabilities of the biochemical buffer tris toward copper(II) ion. structure and magnetic properties of binuclear and tetranuclear systems. *Helv. Chim. Acta.* 67, 1818 – 1826.

111. Nagaj J., Stokowa-Sołtys K., Kurowska E., Frączyk T., Je.owska-Bojczuk M., Bal W. **2013**. Revised coordination model and stability constants of Cu(II) complexes of Tris buffer. *Inorg. Chem.* 52 (24), 13927 – 13933.
112. Harford C., Sarkar B. **1997**. Amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal binding, DNA cleavage, and other properties. *Acc. Chem. Res.* 30, 123 – 130.
113. Mohani B., Arjmand F. **2004**. Template synthesis of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes derived from oxamide ligand and the reactivity of Cu(II). *Bioinorg. Chem. Appl.* 2, 225 – 235.
114. Yu J.-S., Zhang Z.-X. **1997**. Double potential-step chronoamperometry and chronocoulometry at an ultramicrodisk electrode: theory and experiment. *J. Electroanal. Chem.* 439, 73 – 80.
115. Anson F., Caja J. **1970**. The adsorption of vanadium(III) on mercury from thiocyanate solutions and its electrochemical consequences. *J. Electrochem. Soc.* 306 – 314.
116. Cussler E. L. **2009**. Diffusion: mass transfer in fluid systems (third ed.). New York: Cambridge University Press. 126 – 135.
117. Carter M.T., Rodriguez M., Bard J. A. **1989**. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8901 - 8911.
118. Pang D.W., Abruña D. H. **1998** Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules. *Anal. Chem.* 70, 3162 - 3169.
119. Heli H., Sattarahmady N., Jabbari A., Moosavi-Movahedi A. A., Hakimelahi G.H., Fu-Yuan Tsai. **2007**. Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface – Applied to albumin-modified electrode: mode of protein–ligand interactions. *J. Electroanal. Chem.* 610, 67 – 74.

120. Kalanur S.S, Seetharamappa J., Katrahalli U. **2010**. Voltammetric and spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of buzeptide methiodide. *Colloids Surf. B.* 75, 75 – 79.
121. Marín-Medina A., García-Ramos J. C., Ruíz-Azuara L., Carrillo-Nava E. **2016**. Investigation of the self-association of an inorganic coordination compound with biological activity (Casiopeína III-ia) in aqueous solution. *Chem. Cent. J.* 10:65.
122. Schreier S., Malheiros V. P. S., de Paula E. **2000**. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 210 - 234.
123. Andrieux C. P., Saveant J.M. **1992**. Molecular design of electrode surfaces, techniques of chemistry. A. Murray (Ed.), Wiley, New York.
124. Bard A. J. **1994**. Integrated chemical systems: A Chemical Approach to Nanotechnology. Wiley, New York.
125. Farahani B. V., Bardajee G. R., Rajabi F. H., Hooshyar Z. **2015**. Study on the interaction of Co (III) DiAmsar with serum albumins: Spectroscopic and molecular docking methods. *Spectrochim. Acta B.* 135, 410 – 416.
126. Bardajee G. R., Hooshyar Z., Shafagh P., Ghiasvand S., Kakavand N. **2014**. Combined spectroscopic and molecular docking techniques to study interaction of Zn (II) DiAmsar with serum albumins. *JOL.* 156, 55 – 62.
127. Hooshyar Z., Bardajee G. R., Shafagh P., Ghiasvand S., Khanjari M., Dianatnejad N. **2015**. In vitro study on the interaction of Mn(II)-DiAmsar with human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA) by spectroscopic and molecular docking methods. *J. Iran Chem. Soc.* 12, 715 – 725.
128. Guiyun Xu, Jinshi Fan, Kui Jiao. **2008**. Studies on the electrochemical property of dinuclear copper(II) complex containing dimethylglyoxime and its interaction with DNA. *Electroanalysis.* 20, (11) 1209 – 1214.
129. Gowda J. I., Nandibewoor S. T. **2014**. Binding and conformational changes of human serum albumin upon interaction with 4-aminoantipyrine studied by

spectroscopic methods and cyclic voltammetry. *Spectrochim. Acta B.* 124, 397 – 403.

130. Wei Sun, Kui Jiao, Xueliang Wang, Lude Lu. **2005**. Electrochemical studies of the reaction between albumin and amaranth and its analytical application *J. Electroanal. Chem.* 578, 37 – 43.

131. Yining Zeng, Jianyu Liu, Yuanzong Li. **2002**. Electrochemical studies of the interaction of tetraphenylporphyrin tetrasulfonate (TPPS) with an antibody. *Electrochem. commun.* 4, 679 – 683.

132. Fotouhi L., Banafsheh S., Heravi M. M. **2009**. Electrochemistry of the interaction of furazolidone and bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry.* 77, 26 – 30.

133. Dangkoob F., Housaindokht M. R., Asoodeh A., Rajabi O., Zaeri Z. R., Doghaei A. V. **2015**. Spectroscopic and molecular modeling study on the separate and simultaneous bindings of alprazolam and fluoxetine hydrochloride to human serum albumin (HSA): With the aim of the drug interactions probing. *Spectrochim. Acta A.* 137, 1106 – 1119.

134. Li Fu, Xiu-fen Liu, Qiu-xiang Zhou, Ji-xiang Zhang, Jing-ya Dong, Jian-fang Wang. **2014**. Characterization of the interactions of human serum albumin (HSA), gatifloxacin, and metronidazole using spectroscopic and electrochemical methods. *J. Lumin.* 149, 208 – 214.

135. Daneshegar P., Moosavi-Movahedi A. A., Norouzi P., Ganjali M. R., Farhadic M., Sheibani N. **2012**. Characterization of paracetamol binding with normal and glycosylated human serum albumin assayed by a new electrochemical method. *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2), 315 – 321.

136. Suna W., Hana J., Jiao K., Lub L. **2006**. Studies on the interaction of protein with acid chrome blue K by electrochemical method and its analytical application. *Bioelectrochemistry.* 68, 60 – 66.

137. Kalanur S. S., Katrahalli U., Seetharamappa J. **2009**. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. *J. Electroanal. Chem.* 636, 93 – 100.
138. Wang., Sun L., Zou N., Yu Z. **2015**. Electrochemical study on the interaction between dopamine and deoxyribonucleic acid using a glassy carbon electrode modified with silver-doped poly cysteine membrane. *Int. J. Electrochem. Sci.* 10, 7320 – 7330.
139. Li Y. Q., Guo Y. J., Li X. F., Pan J. H. **2007**. Electrochemical studies of the interaction of Basic Brown G with DNA and determination of DNA. *Talanta.* 71, 123 – 128.
140. Ni Y., Wang Y., Kokot S. **2010**. Voltammetric, UV–Vis spectrometric and fluorescence study of the interaction of ractopamine and DNA with the aid of multivariate curve resolution-alternating least squares. *Electroanalysis.* 22 (19), 2216 – 2224.
141. Rezaei Behbehani G., Barzegar L., Mohebbian M., Saboury A. A. **2012**. A comparative interaction between copper ions with Alzheimer's β amyloid peptide and human serum albumin. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012:208641.
142. Jing M., Liu R., Yan W., Tan X., Chen Y. **2015**. Investigations on the effects of Cu^{2+} on the structure and function of human serum albumin. *Luminescence.* 31, 557 – 564.
143. Zhang Y., Akilesh S., Wilcox D. E. **2000**. Isothermal titration calorimetry measurements of Ni(II) and Cu(II) binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and bovine serum albumin: a critical evaluation. *Inorg. Chem.* 39, 3057 – 3064.
144. Trapaidze A., Hureau C., Bal W., Winterhalter M., Falle P. **2012**. Thermodynamic study of Cu^{2+} binding to the DAHK and GHK peptides by isothermal titration calorimetry (ITC) with the weaker competitor glycine. *J. Biol. Inorg. Chem.* 17, 37–47.

145. Celej M. S., Dassie S. A., González M.; Bianconi M. L., Fidelio G. D. **2006**. Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins. *Anal Biochem.* 350, 227 – 284.
146. Rezaei-Tavirani M., Moghaddamnia S.H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. **2006**. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. *J. Biochem. Mol.* 39, 530 – 536.
147. Shrake A., Frazier D., Schwarz F.P. **2006**. Thermal stabilization of human albumin by medium- and short-chain n-alkyl fatty acid anions. *Biopolymers.* 81, 235 – 248.
148. Shrake A., Finlayson J. S., Ross P. D. **1984**. Thermal stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. *Vox Sang.* 47, 7 – 18.
149. Michnik A., Michalik K., Kluczevska A., Drzazga Z. **2006**. Comparative DCS study of human and bovine serum albumin. *J. Therm. Anal. Calorim.* 84, 113 – 117.
150. Garidel P., Hoffmann C., Blume A. **2009**. A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilisation. *Biophys Chem.* 143, 70 – 78.
151. Farruggia B., Rodriguez F., Rigatuso R., Fidelio G., Pico G. **2001**. The participation of human serum albumin domains in chemical and thermal unfolding. *J Protein Chem.* 20, 81 – 89.
152. Pico G. A. **1997**. Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *Int J Biol Macromol.* 20, 63 – 73.
153. Watanabe H., Yamasaki K., Kragh-Hansen U., Tanase S., Harada K., Suenaga A., Otagiri M. **2001**. In vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time. *Pharm Res.* 18, 1775 – 1781.

154. Barone G., Giancola C., Verdoliva A. **1992**. DSC studies on the denaturation and aggregation of serum albumins. *Thermochim. Acta.* 199, 197 – 205.

155. Nick Pace C., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. **1995**. How measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science.* 4, 2411 - 2423.

156. Starý J., Iljenzin O. J. **1982**. Critical evaluation of equilibrium constants involving acetylacetone and its metal chelates. *Pure & Appl.Chem.* 54 (12), 2557 – 2592.

Capítulo 7

Anexos



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

"La química nos une"

otorga el presente

Reconocimiento

a

Alejandro Marín Medina, Dulzura Méndez Ramírez, Gonzálo López Marroquín, Ernesto Carrillo Nava

por su participación presentando el **Trabajo Profesional en Modalidad Cartel** titulado

Estudio de la adsorción de la albumina sérica humana sobre un electrodo de carbón vítreo mediante ensayos electroquímicos. ELEQ-P1-C

en el marco de las actividades del

52° Congreso Mexicano de Química

36° Congreso Nacional de Educación Química

Puerto Vallarta, Jalisco, México

26 al 29 de septiembre de 2017

Dra. María del Jesús Rosales Hoz
Presidente de Congresos
Sociedad Química de México, A.C.

Dra. Ruth Padilla Muñoz
Presidente Local de Congresos, 2017
CUCEI, UdG

Anexo A



Estudio de la adsorción de la albumina sérica humana sobre un electrodo de carbón vítreo mediante ensayos electroquímicos

Alejandro Marín Medina^{1*}, Dulcira Mándos Ramírez, González López Marroquín, Emma Corrallo Nava^{1*}
 1 Laboratorio de Bioelectroquímica, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, UNAM, México, CDMX, 04510.
 *marin_madina7@hotmail.com, *emma.corrallo@unam.mx



ELEQ-P1-C

Introducción

El estudio de la adsorción de proteínas sobre superficies sólidas es de gran interés debido a que se ha reconocido que la adsorción de estas sobre la superficie de sensores, chips o plataformas de ensayo es inespecífico y provoca que los sistemas de detección tengan un cambio en la señal que puede ser aprovechado para diversos fines. En electroquímica la adsorción de proteínas sobre los electrodos sólidos modifica las señales obtenidas. Este fenómeno permite entonces la construcción de electrodos modificados, con los cuales es posible estudiar procesos electroquímicos de compuestos de interés biológico, interacciones entre la proteína adsorbida y algún compuesto electroactivo⁽¹⁾. En este trabajo se reporta un método para la construcción de un electrodo modificado, mediante la adsorción de la proteína albumina sérica humana (ASH) sobre una superficie del carbón vítreo. Esta proteína es la más abundante en el plasma de la sangre humana y una de sus principales funciones es transportar moléculas como ácidos grasos, ácidos biliares, vitaminas D y B12, hormonas y cationes metálicos como Mn, Zn, Au, Ni y Cu⁽²⁾. Esta la convierte en una proteína muy interesante para la construcción de biosensores o plataformas de ensayo específico. Mediante voltamperimetría cíclica empleando un electrodo modificado con ASH hemos establecido que las interacciones entre esta proteína y especies que poseen iones de Cu²⁺ y Cu¹⁺ son de tipo electrostático o covalente⁽³⁾.

Experimental

- Temperatura de ensayo (22 ± 1) °C
- Área del ánodo (0.163 cm²)
- Disolución soporte: 0.1 M HClO₄ (sol¹), 0.1 M KClO₄ (sol²) y 0.1 M NaCl (sol³)
- Concentración de las especies electroactivas: 0.01 mol/L (electrodo de platino) 0.01 mol/L (electrodo de carbono)
- CMBs electroactivos: 100 μmol/L (sol¹) 100 μmol/L (sol²)
- Concentración de ASH (proteína) 0.0005 g/L



Figura 1. Preparación del Electrodo de Carbón Vítreo modificado con albumina sérica humana (ASH) en un electrodo de carbono.

Condiciones de ensayo

- Carbon Vitreous (CV)
- Carbon Vitreous (modificado) (CV-ASH)

Medios de Referencia

- Ag / AgCl / KCl 0.1 M
- Pt / 0.222 V / N.H.₃
- Medios de soporte: 0.1 M NaCl

Electrodo Auxiliar

- Alambre de Pt en forma de espiral

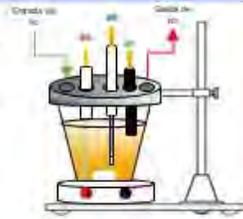


Figura 2. Celda electroquímica.

Resultados

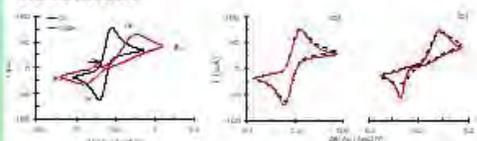


Figura 3. Voltamperogramas cíclicos en solución de potasio ferrioxalato (KFO) sobre el electrodo de carbono vítreo (CV) y sobre el electrodo de carbono vítreo modificado con ASH (CV-ASH) en un electrolito soporte de 0.1 M NaCl.

Tabla 1. Parámetros electroquímicos obtenidos para las especies electroactivas en la Figura 3.

Electrodo	CV	CV-ASH
E _{pa} / V	0.420 ± 0.002	0.420 ± 0.002
E _{pc} / V	0.440 ± 0.002	0.440 ± 0.002
E _{pa} - E _{pc} / V	0.020 ± 0.002	0.020 ± 0.002
i _{pa} / A cm ⁻²	1.50 ± 0.05	1.50 ± 0.05
i _{pc} / A cm ⁻²	1.50 ± 0.05	1.50 ± 0.05
i _{pa} / i _{pc}	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05

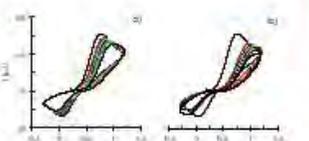


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos en solución de potasio ferrioxalato (KFO) sobre el electrodo de carbono vítreo (CV) y sobre el electrodo de carbono vítreo modificado con ASH (CV-ASH) en un electrolito soporte de 0.1 M NaCl.

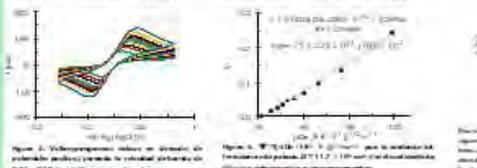


Figura 5. Voltamperogramas cíclicos en solución de potasio ferrioxalato (KFO) sobre el electrodo de carbono vítreo (CV) y sobre el electrodo de carbono vítreo modificado con ASH (CV-ASH) en un electrolito soporte de 0.1 M NaCl.

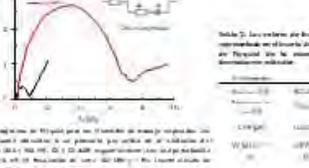


Figura 6. Dependencia de i_{pa} con el número de barridos por segundo (ν) para el electrodo de carbono vítreo (CV) y para el electrodo de carbono vítreo modificado con ASH (CV-ASH) en un electrolito soporte de 0.1 M NaCl.

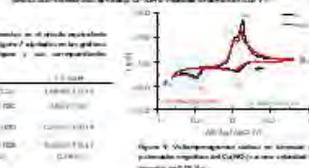


Figura 7. Voltamperogramas cíclicos en solución de potasio ferrioxalato (KFO) sobre el electrodo de carbono vítreo (CV) y sobre el electrodo de carbono vítreo modificado con ASH (CV-ASH) en un electrolito soporte de 0.1 M NaCl.

Conclusiones

La modificación de la superficie del carbón vítreo con la proteína (ASH), es una buena estrategia para estudiar el tipo de interacción entre especies electroactivas y esta proteína. Los parámetros electroquímicos de un estándar electroquímico como el ferrioxalato de potasio se ven fuertemente modificados al realizar procesos redox sobre superficies modificadas con la proteína ASH.

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de este proyecto de investigación dentro del programa de becas de doctorado otorgado por el CONACYT.
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) de la UNAM (PAPIT) por el financiamiento al proyecto "Estudio Electroquímico de la Interacción de la Proteína Albumina Sérica Humana con el Electrodo de Carbono Vítreo" (PAPIT/1614207/16).

Referencias

1. Hill H, Semerády H, Joliban A, Moosavi-Movahedi A.A., Holmeide D.H., Fu-Yun J. 2007. Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface - Application to albumin-modified electrode, mode of protein-ligand interactions. J. Electroanal. Chem. 610, 67-74.
2. Comer D. C., Ho J. R. 1994. Structure of human albumin. Adv. Protein Chem. 45, 153-203.
3. Comer M.J., Rodríguez M., Bero L.A. 1998. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Interaction of cobalt(II) and iron(III) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. J. Am. Chem. Soc. 120, 8901-8911.



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

"La química nos une"

otorga el presente

Reconocimiento

a

Alejandro Marín Medina y Ernesto Carrillo Nava

por su participación presentando el **Trabajo Profesional en Modalidad Cartel** titulado

Determinación electroquímica del tipo de interacciones que se establecen entre un compuesto de coordinación de Cu (II) con actividad biológica y la proteína albumina sérica humana. ELEQ-P2-C

en el marco de las actividades del

52° Congreso Mexicano de Química

36° Congreso Nacional de Educación Química

Puerto Vallarta, Jalisco, México

26 al 29 de septiembre de 2017

Dra. María del Jesús Rosales Hoz
Presidente de Congresos
Sociedad Química de México, A.C.

Dra. Ruth Padilla Muñoz
Presidente Local de Congresos, 2017
CUCEI, UAG

Anexo B'



Determinación electroquímica del tipo de interacciones que se establecen entre un compuesto de coordinación de Cu(II) con actividad biológica y la proteína albumina sérica humana

Alejandro Marín Medina*, Ernesto Carrillo Naval

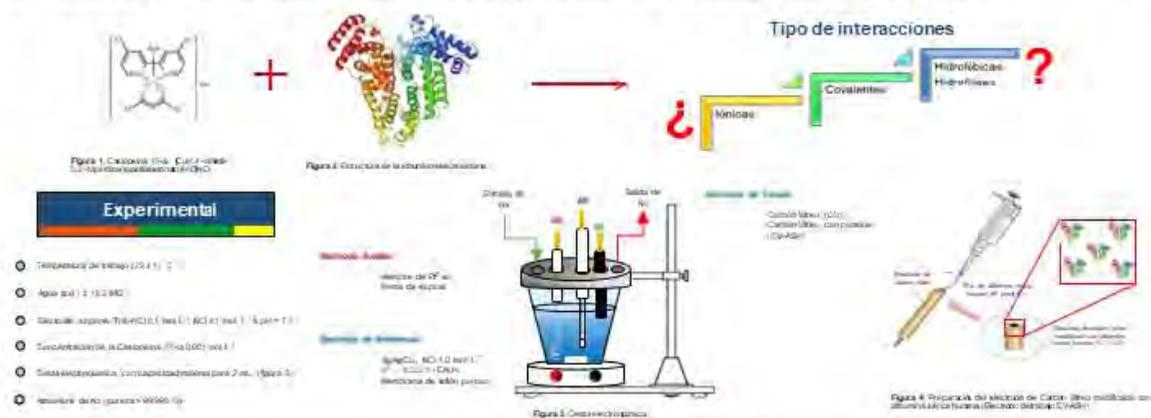
Laboratorio de Biofisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Química, UNAM, México, CDMX, 04510

*marin_medina7@hotmail.com, *ernesto.carrillo@ciqa.unam.mx

SOCIIDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, S.C.
ELEQ-P2-C

Introducción

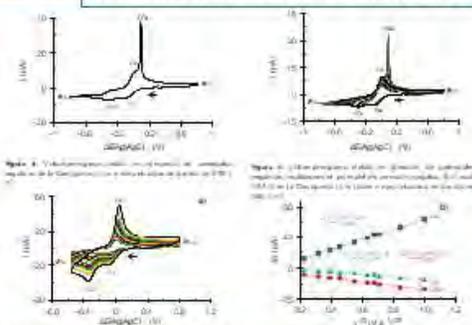
La Casiopeína III-ia (figura 1) es un compuesto de coordinación con centro metálico de Cu(II) presentan actividad citotóxica^[1]. El objetivo de estudiar las interacciones específicas de compuestos con alguna actividad biológica con proteínas es el de guiar un desarrollo inteligente de fármacos con una mayor especificidad y reducir los efectos secundarios indeseables. En este trabajo se empleó a la proteína albumina sérica humana (figura 2), que es una proteína muy abundante en el plasma humano, lo que la convierte en un vehículo potencial para transportar a la Casiopeína III-ia en el torrente sanguíneo. El centro metálico de la Casiopeína posee propiedades redox que nos permitan aprovecharlas, para elucidar el tipo de interacciones posibles entre la Casiopeína y la proteína mediante estudios electroquímicos. Estudios recientes han demostrado que el comportamiento electroquímico de moléculas que interactúan con proteínas, se ve modificado por la adsorción de la proteína sobre el electrodo de trabajo. Estas modificaciones permiten inferir el tipo de interacción entre la molécula electroactiva y la proteína^[2,3].



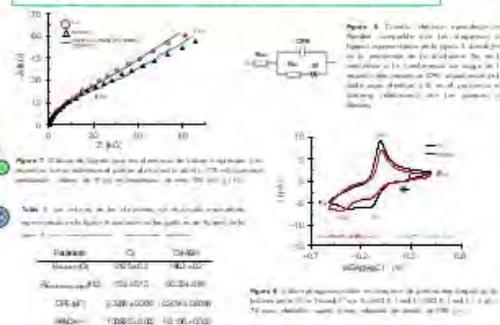
Experimental

- Temperatura de trabajo (25 ± 1) °C
- Agua deionada (18.2 MΩ)
- Solución soporte: $0.1 M NaCl$ (pH 7.4) y $0.1 M NaNO_3$
- Concentración de la Casiopeína (10^{-4} mol/L)
- Solución de albumina sérica humana (concentración de 2 mg/mL) (Figura 5)
- Resolución de datos (escala) = 100000 Sp

Caracterización de Casiopeína III-ia en un medio acuoso a pH fisiológico



Estudio del tipo de interacción entre de la proteína A SHy la Casiopeína III-ia



Resultados

Tabla 1. Datos de las interacciones electroquímicas de Casiopeína III-ia con la proteína A SHy.

Proteína	C ₁	C ₂	C ₃
Albumina sérica humana	0.000000	0.000000	0.000000
CV (E _{1/2})	0.338 ± 0.008	0.250 ± 0.008	0.250 ± 0.008
ΔE _{1/2}	0.088 ± 0.002	0.088 ± 0.002	0.088 ± 0.002
n	0.94	0.94	0.94

Conclusiones

La modificación de la superficie del carbono vítreo con la proteína y el uso de las técnicas electroquímicas, son una buena estrategia para establecer el tipo de interacciones que se establecen entre la Casiopeína y la proteína.

Se encontró que este compuesto de coordinación con actividad biológica en su estado de oxidación 2+ presenta interacciones del tipo hidrofóbicas/hidrofilicas con la proteína albumina sérica humana y en estado de oxidación 1+ las interacciones son de naturaleza electrostática o covalente^[3-5].

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto de investigación a través de la Beca Nacional de Estudios de Posgrado con clave de registro 603088.
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT) por el financiamiento al proyecto: "Análisis Electroquímico de compuestos de Casiopeína e interacciones Casiopeína/Albumina" (6207116R207116)

Referencias

- Cayula-Quigley, F., Trejo-Solis, C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez-Aguilera, E., Macías-Rosales, L., Gómez-Barbena, E., Castro-Palacio, C., Gado-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Muro-Molina, V., Constantino-Casas, F. *BioMetals* 21 (2008) 17-26.
- Peng Dai-Wen, Anuj-Hadar D. *Anal. Chem.* 70 (1998) 3162-3169.
- Hil, H., Schatzmayr, N., Jassal, A., Mosal-Maxamed, A.A., Halmidji, GH., Ruyuan, Ba, J. *Electroanal. Chem.* 610 (2007) 67-74.
- Kalauer S.S., Satharampalli, J., Kishore, U. *Colloid. Surf., B.* 75 (2010) 75-79.
- Carter M.T., Rodríguez M., Bad J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 8901-8911.