



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE QUERCETINA

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS (QUÍMICA ANALÍTICA)

PRESENTA

QUÍMICA TERESA JAENS CONTRERAS

**TUTOR: DR. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS
FACULTAD DE QUÍMICA.**

Ciudad de México, Septiembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE QUERCETINA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS (QUÍMICA ANALÍTICA)

PRESENTA

Q. TERESA JAENS CONTRERAS

DR. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS
FACULTAD DE QUÍMICA.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha dado y por su contribución tan valiosa a forjar generaciones críticas, con conciencia social y bien preparadas. Gracias por ser fuente inagotable de saber, formación y superación.

Al Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas mil gracias por la infinita paciencia tenida para con mi persona, gracias por todo lo que me permites aprender, por los consejos y aún por los regaños, gracias por ayudarme a comprender ésta área tan bonita de la Química Analítica, la Electroquímica y sobre todo por permitirme conocer tu maravillosa persona.

A Conacyt por el otorgamiento de beca durante el tiempo en que realicé estudios de maestría. Gracias

A los sinodales: Dr. René Miranda Ruvalcaba, Dra. Ana Sofía Varela Gasque, Dr. Julio César Aguilar Cordero, Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar, Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén, gracias por el tiempo dedicado para la revisión del trabajo, por la retroalimentación del mismo, por la paciencia y por todas sus enseñanzas, infinitas gracias.

A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de BiotecnologíaUPIBI del IPN: mi centro de trabajo por las facilidades otorgadas para la realización de la estancia sabática en la que se realizó parte del trabajo experimental de esta tesis.

A mi Dios Yavhé: Gracias al Dios Trino (Padre, Hijo y Espíritu Santo) por tu amor inagotable e incondicional, porque sostienes mi vida y le das propósito y sentido.

A la memoria de mis padres, con mucho cariño: Tomasa Contreras Perea y Dolores Jaens Zarco. Los recuerdo mucho, viven en mi corazón gracias por todo.

A Lucio Martínez Juárez mi querido esposo, gracias por tu apoyo y amor incondicional, gracias por estar en mi vida y ser parte de lo que le da alegría a la misma. Gracias por estar durante mis ausencias con mis hijas. Te amo Lucio.

A mis hijas Lissete Jael y Daniela Nicole por estar en mi vida, por su apoyo y comprensión en éste tiempo que me dediqué a la escritura y corrección de este trabajo. Gracias hijas las amo.

A mis hermanos Alfredo, Araceli, David, Alberto, Mary. Por su cariño y apoyo gracias.

A mis sobrinos: Jaime, Daniel, Cristian, Nancy, Beto, Fátima, Ingrid. Gracias por las porras y por su apoyo brindado de diversas maneras.

A Juan Ramírez Balderas: Gracias por el apoyo para la realización de éste trabajo. Por enseñarme tantas cosas del trabajo en Química Analítica y por ser amigo muy querido para mí.

A los jóvenes del laboratorio 114 de Química Analítica de la Facultad de Química UNAM, por el apoyo que me brindaron durante la estancia sabática para la realización de este trabajo: Edgar, Gerardo, Leo, Alex, Eduardo, Erick; mil gracias.

¡Demos gracias al Señor, porque es bueno!
Demos gracias al Dios de los dioses
Demos gracias al Señor de los señores
Demos gracias al único que hace grandes maravillas
Demos gracias al que hizo los cielos con tanta habilidad
Demos gracias al que ubicó la Tierra sobre las aguas
Demos gracias al que hizo las lumbreras celestiales:
el sol para que gobierne el día,
la luna y las estrellas para que gobiernen de noche!.
Él se acordó de nosotros en nuestras debilidades!
Nos salvó de nuestros enemigos.
Él provee alimento a todo ser viviente.
Demos gracias al Dios del cielo.
Su fiel amor perdura para siempre
¡Porque tú formaste mis entrañas te alabaré porque formidables
maravillas son tus obras!. La biblia Salmo 136 NTV.



Hombre jaguar, pintura mural de Cacaxtla, Tlaxcala. Utilización de pigmentos vegetales (entre ellos los flavonoides) y pigmentos minerales, entre ellos, azul maya, grana cochinilla para el rojo, cal para el blanco.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 La quercetina	1
2.2 Flavonoides	2
2.3 Antioxidantes	3
2.4 Polarografía	4
3. OBJETIVOS	5
4. METODOLOGÍA	
4.1 Reactivos	6
4.2 Equipo	6
4.3 Muestras analizadas	6
4.4 Comportamiento ácido-base de quercetina mediante potenciometría. Valoración pH métrica por retroceso	7
4.5 Formación de complejos de quercetina con diversos metales, pruebas cualitativas	7
4.6 Estandarización de CuCl_2 mediante polarografía con cobre electrolítico	7
4.7 Estudio electroquímico fundamental de quercetina mediante polarografía clásica (PC) y polarografía diferencial de impulsos (PDI).	8
4.8 Estudio electroquímico de la formación de complejos de quercetina con Cu^{2+} . Valoraciones complejométricas	8
4.9 Estudio electroquímico de la formación de complejos de Cu^{2+} con quercetina	9
4.10 Determinación de quercetina en muestras comerciales de caléndula	9
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	
5.1 Valoración por retroceso de quercetina + NaOH con $\text{HCl } 0.01 \text{ molL}^{-1}$	9
5.2 Pruebas cualitativas de complejación de quercetina	11
5.3 Estandarización de CuCl_2 por PDI	12

5.4 Estudio electroquímico fundamental de quercetina mediante PC y PDI	14
5.4.1. Polarografía clásica	14
Estudio logarítmico y gráfico de Tafel	17
5.4.2 Polarografía diferencial de impulsos (PDI)	18
5.5 Estudio electroquímico de la formación de complejos de quercetina con Cu ²⁺ . Valoraciones complejométricas	20
5.6 Estudio electroquímico de la formación de complejos de Cu ²⁺ con quercetna. Valoraciones complejométricas	22
5.7 Determinación de quercetina en muestras comerciales de caléndula	26
5.8 Polarografía clásica y diferencial de impulsos de crisina 0.01 molL ⁻¹ y flavona 0.01 molL ⁻¹	29
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA	32
8. ANEXOS	
Anexo 1. Estudio logarítmico de la señal de reducción de quercetina	34
Anexo 2. Gráficos de Tafel	36
Anexo 3. Linealidad y límite de detección	38
Anexo 4. Determinación de las constantes de formación de los complejos, método relación de intensidades.	40
Anexo 5. Estudio logarítmico para obtener la constante heterogénea de transferencia de carga k° .	41

1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son un tipo importante de compuestos polifenólicos de origen vegetal, formados por dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo heterocíclico de pirona. Se caracterizan por poseer una alta capacidad antioxidante. Entre los flavonoides más destacados tenemos a la quercetina, las antocianinas, el kaemferol, rutina, crisina y la flavona, entre otros.

Los flavonoides se obtienen mediante la ingesta de productos de origen vegetal; la quercetina, por ejemplo se encuentra en manzanas, cebolla, té verde, té negro, brócoli, etc (Crozier A., Lean M.E.J., McDonald M.S., Black C., 1997). Los antioxidantes naturales junto con algunos otros productos también de origen natural crean un efecto sinérgico beneficioso para la salud, como su actuación con la vitamina C, ya que ésta última reduce la oxidación de la quercetina, manteniendo sus funciones antioxidantes por más tiempo, o bien la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E (Martínez S., González J. Culebras J. y Tuñón Ma. J., 2002) . La importancia farmacéutica de los flavonoides ha sido ampliamente investigada por sus propiedades antiinflamatorias, antibacteriales, antivirales, antialérgica, anticancerígenas, antioxidantes (Hanasaki, 1986; Hertog 1996 y Middleton 1993), así mismo la aplicación de quercetina presenta muy buenos resultados contra la artritis reumatoide (Haleagrajara N., Miranda S., Abdul M., Hayes L., Bird G., Ketheesan N., 2017) El conocimiento del comportamiento electroquímico de los flavonoides también es importante para ayudar a comprender la forma de acción de los mismos como poderosos antioxidantes. Los antioxidantes son compuestos que retardan o inhiben la degradación oxidativa de las moléculas. Ya que la mayoría de los antioxidantes son sintéticos pueden generar efectos tóxicos por su inestabilidad, de ahí que los antioxidantes naturales como los flavonoides sean de gran importancia

Los complejos de cobre (II) han sido ampliamente estudiados como fármacos antiinflamatorios, demostrando que la actividad antiinflamatoria de este tipo de compuestos es superior a la de los ligantes sólo cuando éstos presentan dicha actividad, o se genera cuando el ligante no la posee (Amoros M., Simoes C., Girre L., Sauvager F., Cornier M. 1992). De acuerdo con lo anteriormente revisado es importante estudiar la complejación entre quercetina y cobre, por dos razones: ambos ayudan a disminuir la inflamación, y además puede usarse dicha complejación como una posible vía de desintoxicación del cuerpo humano contaminado con metales. Es por ello, que en el presente trabajo se estudia el comportamiento electroquímico de la quercetina y la complejación de Cu^{2+} con quercetina.

2. ANTECEDENTES

2.1 La quercetina

La quercetina, también llamada 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4*H*-1-benzopirán-4-ona, ó 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona y de nomenclatura común meletina y sofoterina, de fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, y peso molecular 302.23 g/mol, está distribuída en el reino vegetal, en cáscaras, cortezas, flores, semillas y en polen (Merck Index, 1989).

Se encuentra como dihidrato; su aspecto es de agujas amarillas solubles en alcohol anhidro de 95 a 97° (Figura 1). Es una sustancia que forma parte de los flavonoides. En las plantas, la quercetina se encuentra unida a azúcares, formando glucósidos hidrofílicos muy difíciles de absorber. Estos últimos son hidrolizados en el intestino delgado. Así, tras la hidrólisis, la quercetina aglicada es absorbida eficientemente.

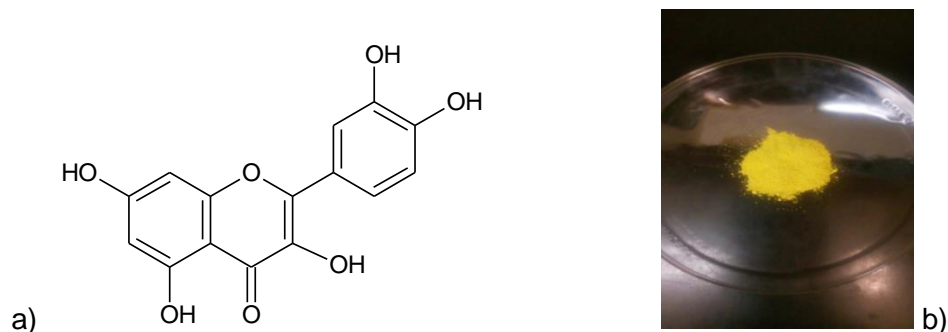


Figura 1 a) Estructura química de la quercetina, b) Aspecto físico de quercetina

2.2 Flavonoides

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. La estructura base de los flavonoides es un esqueleto C6-C3-C6; se caracterizan por ser polifenólicos y muchos de ellos solubles en agua. Los flavonoides son una gran familia compuesta por más de 4000 metabolitos secundarios vegetales que incluye antocianinas, flavonoles, flavonas, catequinas y flavononas (Harborne, 1994)

Los flavonoides se caracterizan por tener un núcleo de flavona compuesto por dos anillos de benceno, unidos por un anillo heterociclo de pirona; la quercetina se encuentra principalmente en manzanas, cebollas, té verde, té negro, vino tinto, algunas semillas y en flores de caléndula (Kuhmau, J., 1976). A continuación se puede ver en las figuras 2 y 3, las estructuras químicas de la flavona y la crisina, dos flavonoides de gran interés.

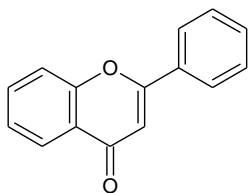


Figura 2. Flavona

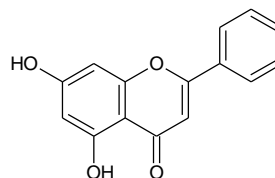


Figura. 3 Crisina

La quercetina se clasifica como un flavonol o 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona; se encuentra en la flor de caléndula (figura 4).



Figura 4. *Calendula officinalis*

Las extracciones etanólicas de las flores de caléndula contienen quercetina y algunos otros flavonoides; las preparaciones de la tintura de caléndula, usados con fines farmacéuticos pueden contener del 2 al 10% de flavonoides. La caléndula también es conocida como maravilla, copetuda y en inglés marygold (Muñoz F., 1987)

Los resultados experimentales de múltiples trabajos demuestran que la quercetina y algunos otros flavonoides poseen numerosos efectos benéficos para la salud humana, incluida la protección cardiovascular, los efectos antiulcerosos y las propiedades antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias, antimutagénicos, y anticancerígenas (Amoros M., Simoes C., Girre L., Sauvager F., Cornier M. 1992; Manthey J., Guthrie N. 2002; Hanasaki 1986; Hertog 1995). La importancia fitofarmacéutica de los flavonoides ha sido ampliamente investigada debido a sus propiedades benéficas para la salud. Muchos de estos efectos están correlacionados con la capacidad antioxidante de los flavonoides y a la eliminación de radicales libres; así como a los efectos sinérgicos con enzimas y antioxidantes fisiológicos.

2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables. Los antioxidantes en la industria alimentaria también se llaman conservadores o preservadores. Los fenoles, compuestos con un grupo -OH unido a un anillo aromático son antioxidantes eficientes. Los radicales libres de éstos compuestos están estabilizados por resonancia, como se ve en la figura 5, y por lo tanto son no reactivos comparados con otros radicales libres (Fessenden, 1983). Esta característica también la presentan los flavonoides.

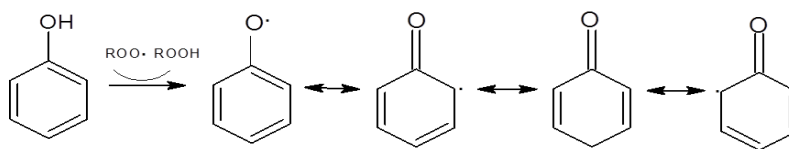
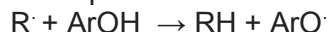


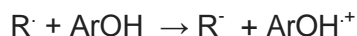
Figura 5 Estructuras de resonancia del radical libre fenol

Por el modo de acción, podemos clasificar a los antioxidantes como: primarios (interrumpen la reacción en cadena generando un radical menos activo) y secundario (o preventivo).

El principal mecanismo por el cual se cree actúan los flavonoides como antioxidantes es porque el radical libre R^\cdot puede remover un átomo de hidrógeno del antioxidante.



El segundo mecanismo de acción de los antioxidantes es que el radical libre puede tomar un electrón del antioxidante



Las especies originadas ArO^\cdot , $ArOH^{\cdot+}$ son estables para prevenir o retrasar las reacciones de radicales en cadena (McMurry, 2011).

En diversos estudios se ha encontrado que los flavonoides pueden inactivar radicales peróxido en una manera igual o incluso mejor que antioxidantes tradicionales, como el BHT (Jovanovic S., *et al*, 1994). En los flavonoides, la estructura cetónica α,β insaturada del anillo de la pirona, el grupo OH en la posición 3 y los OH en posición *orto* del anillo B (figura 8b), son los grupos responsables de la actividad antioxidante (Katyal 1968).

2.4 Polarografía

La polarografía fue inventada por Jaroslav Heyrovsky en Charles University en Praga en 1925 (Vassos y Ewing, 1998). Es una técnica experimental basada en la relación que existe entre voltaje (E) e intensidad de corriente (i) durante un proceso electroquímico, donde se tiene como electrodo de trabajo al electrodo de mercurio. Normalmente utiliza un sistema de tres electrodos: los electrodos de trabajo ó indicador pueden ser Hg° , Pt° , grafito, oro, etc. (cuando no se utiliza el electrodo de Hg° como electrodo de trabajo la técnica es conocida como voltamperometría), como electrodo de referencia se utilizan el electrodo saturado de calomel, electrodo de plata/cloruro de plata (ESC, $Ag/AgCl$) y como electrodo auxiliar o contra electrodo se emplean electrodos de Pt .

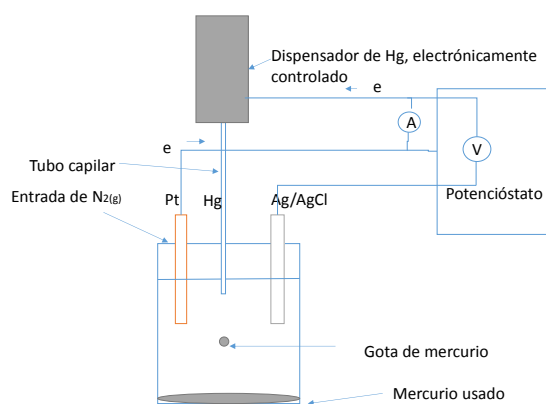


Figura 6. Esquema de la celda para polarografía. Sistema de tres electrodos.

Se utiliza un electrodo de mercurio como electrodo de trabajo porque la superficie del mercurio constantemente renovada tiene un comportamiento reproducible de corriente-potencial. Con cualquier otro electrodo de trabajo, por ejemplo grafito, Pt°, etc., la corriente depende del estado de la superficie del electrodo y por lo tanto, de su historia anterior (Harris 2006). Con el electrodo de mercurio se pueden investigar sustancias que presenten potenciales de reducción, mientras que con platino o grafito se investigan los potenciales positivos ó de oxidación. En el caso del mercurio su propia oxidación limita la zona de oxidación.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio electroquímico básico de quercetina (3,3',4',5,7 pentahidroxi flavona), así como su determinación y cuantificación electroquímica en tinturas de caléndula comerciales utilizadas con fines farmacéuticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar las propiedades ácido-base de la quercetina.
2. Realizar pruebas cualitativas de complejación de quercetina con diferentes cationes metálicos
3. Estudiar el comportamiento electroquímico de la quercetina en mezclas etanol-agua 80:20 (v/v) por polarografía clásica y por polarografía diferencial de impulsos.
4. Evaluar parámetros electroquímicos, tales como: potencial de media onda ($E_{1/2}$), número de electrones (n).
5. Establecer las condiciones para la determinación de quercetina por métodos polarográficos
6. Estudio electroquímico de la complejación de quercetina con Cu(II) mediante polarografía diferencial de impulsos (PDI) y determinación de las constantes de formación del o de los complejos formados.
7. Aplicar los resultados de los estudios previos para la cuantificación de la quercetina en productos comerciales de caléndula

4. METODOLOGÍA

4.1 Reactivos

Tabla 1. Reactivos usados y calidad de los mismos.

REACTIVO	PUREZA	MARCA COMERCIAL
Quercetina dihidratada	98 %	Sigma- Aldrich
Etanol	Absoluto	Analytyka
Agua desionizada		
Cloruro de cobre dihidratado	R.A.	Mallinckrodt
Acetato de amonio	R.A.	Técnica química
Hidróxido de sodio	R.A.	Alvi
Ácido Clorhídrico	R.A.	Reproquifin
Carbonato de sodio	R.A.	Técnica química
Nitrógeno de alta pureza	99.9%	Praxair
Cobre electrolítico	100%	S.M.
EDTA disódico	R.A.	Merck
Biftalato de potasio	R.A.	Baker

4.2 Equipo

- Polarógrafo VA 797 Computrace Metrohm.
- Electrodo de referencia Ag/ AgCl/ KCl 3 mol/L; electrodo auxiliar Pt; electrodo de gota de Hg como electrodo de trabajo.
- Balanza analítica Mettler AE240.
- Conductímetro 644, Metrohm.
- Sonda conductimétrica Pt 6.090-110, Metrohm.
- Potenciómetro 827 pH lab Metrohm.
- Electrodo combinado para medir pH: membrana selectiva H⁺/ Ag/AgCl/ KCl 3 mol/L.

4.3 Muestras analizadas

- Tintura madre de caléndula de Erongarícuaro 2003.
Aspecto: líquido de color café intenso.
- Caléndula Hering en spray, lote Núm 1012. Muestra 3, 2014.
Marca: Laboratorios Homeopáticos.
Aspecto: Líquido color amarillo-café.
- Caléndula Oaxaca.
Aspecto: Líquido de color café intenso.

4.4 Comportamiento ácido-base de quercetina, mediante potenciometría

Valoración potenciométrica por retroceso

Se prepara una disolución de quercetina de concentración aproximada 0.01 mol/Litro en la mezcla de disolventes etanol-H₂O 80:20, se adicionan 45.00 mL de NaOH 0.0892 mol/L preparada en H₂O; la valoración se lleva a cabo por potenciometría utilizando un electrodo combinado para la medición de pH, el cual consta de una membrana selectiva de iones H⁺ como electrodo de trabajo y Ag/AgCl/KCl 3 mol/L como electrodo de referencia. Se utiliza HCl 0.01049 mol/L como valorante. La alícuota de quercetina es de 5.0 mL

4.5 Formación de complejos de quercetina con diversos metales, pruebas cualitativas

Se realizan las pruebas a la gota para verificar la formación de complejos, se utiliza quercetina disuelta en etanol-agua 80:20, estandarizada en el experimento 4.4. Se utilizan diversas soluciones de cationes metálicos y se observan los efectos de la reacción.

4.6 Estandarización de CuCl₂ mediante polarografía con cobre electrolítico.

La estandarización del CuCl₂ (catión metálico a usarse para la complejación del mismo con la quercetina) preparado en etanol-H₂O 80:20, se lleva a cabo mediante PDI. Se utiliza como electrolito soporte buffer de acetatos de pH 5.0. Se toma una alícuota de 10.0 mL del electrolito soporte y se traza la curva de intensidad residual, inmediatamente después de burbujear con N₂ por espacio de 5 minutos, para determinar la zona de electroactividad. Se hace un barrido de potencial de -0.3 V a -1.9 V, respecto al electrodo Ag/AgCl/KCl. Se utiliza una amplitud de pulso de 50 mV, un tiempo de pulso de 40 ms y una velocidad de barrido de 0.05 V/s. Como electrodo de trabajo se usa el electrodo de gota de mercurio (EGM), como electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 mol/L, y electrodo de platino como electrodo auxiliar.

En la disolución de electrolito soporte, una vez trazada la curva de intensidad residual, se realizan tres adiciones de CuCl₂ de 50 µL cada una y se traza el polarograma tras cada adición. Posteriormente se hacen 5 adiciones sucesivas de 5 µL de cobre electrolítico 0.1140 mol/L y se traza los polarogramas tras cada adición. Se miden las intensidades de pico para la señal del Cu²⁺ y se obtiene la curva de Ip vs [Cu²⁺] adicionada, extrapolando a x=0 en la curva obtenida se encuentra la concentración de CuCl₂.

4.7 Estudio electroquímico fundamental de quercetina, mediante polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos.

Polarografía clásica (PC)

Se utiliza quercetina de concentración 0.0094 mol/L disuelta en la mezcla de 80% etanol y 20% H₂O, y se utiliza como electrolito soporte acetato de amonio 0.1 mol/L en el sistema de disolventes mencionados anteriormente.

Se utiliza un electrodo de gota de mercurio (EGM) como electrodo de trabajo, Pt como electrodo auxiliar y Ag/AgCl/KCl 3 mol/L como electrodo de referencia. Se traza inicialmente la curva *I-E* del electrolito soporte con un burbujeo previo de N₂ de cinco minutos para quitar las interferencias de oxígeno disuelto, a esta curva también se le llama curva de corriente residual; esto se hace para determinar el dominio de electroactividad. Posteriormente, se adicionan alícuotas sucesivas de quercetina y se traza las curvas *I-E* con un barrido lineal de potencial. El potencial de inicio es de 0.3 V, potencial final de -1.9 V, respecto al electrodo de Ag/AgCl/KCl. Se utiliza un paso de voltaje de 50 mV, velocidad de barrido 50 mV/s, tiempo de vida de la gota 4 s. Se registra cada polarograma de barrido lineal.

Polarografía diferencial de impulsos (PDI)

Las condiciones de trabajo son: Potencial de inicio 0.3 V, potencial final -1.9 V, respecto a Ag/AgCl/KCl; amplitud del pulso 50 mV, tiempo del pulso 40 s, paso de voltaje 5 mV, velocidad de barrido 5 mV/s.

Electrodo de trabajo mercurio (EGM), electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 mol/L y platino como electrodo auxiliar. Se utilizan 10.0 mL de acetato de amonio 0.1 mol/L como electrolito soporte. La quercetina es de una concentración de 0.009 mol/L.

4.8 Estudio electroquímico de la formación de complejos de quercetina con Cu(II). Valoraciones complejométricas

Este estudio se lleva a cabo mediante polarografía diferencial de impulsos (PDI)

Las condiciones de trabajo son: potencial de inicio 0.3 V, potencial final -1.9 V vs. Ag/AgCl/KCl; velocidad de barrido 5 mV/s, amplitud del pulso 50 mV, duración del pulso 40 ms.

El equipo utilizado fue un polarógrafo Metrohm VA 797 con un electrodo de trabajo de gota de mercurio (EGM), como electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 mol/L y como electrodo auxiliar un electrodo de Pt. Electrolito soporte: acetato de amonio 0.1 mol/L en EtOH-H₂O 80:20. Se toma una alícuota de 20.0 mL de quercetina 0.009 mol/L y CuCl₂ 0.0096 mol/L preparados ambos en etanol-H₂O 80:20.

Se traza primero la curva de intensidad de corriente residual de 20.0 mL de acetato de amonio 0.1 mol/L como electrolito soporte, después de burbujear con N₂ durante 5

minutos. Posteriormente se hacen adiciones sucesivas de quercetina de 50 μL y se van añadiendo alícuotas de CuCl_2 , se traza el polarograma tras cada adición y se analiza la modificación de las curvas I_p vs E . Se obtienen los gráficos de I_p vs relación de moles para obtener la relación estequiométrica entre metal y ligando, así como las constantes de formación globales (β) para el o los complejos formados.

4.9 Estudio electroquímico de la formación de complejos de Cu(II) con quercetina

El procedimiento es idéntico que el experimento 4.8 solo que ahora se tienen 300 μL de CuCl_2 en celda, se hacen adiciones de 50 μL de quercetina. Se trazan los polarogramas respectivos tras cada adición y después de burbujear durante 3 minutos con N_2 .

4.10 Determinación de quercetina en muestras comerciales de caléndula

Las condiciones de trabajo son: potencial de inicio 0.3 V, potencial final -1.9 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$; amplitud del pulso 50 mV, tiempo del pulso 40 s, paso de voltaje 5 mV, velocidad de barrido 5 mV/s. Electrodo de trabajo mercurio (EGM), electrodo de referencia $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3 mol/L y platino como electrodo auxiliar. Se hace la determinación por el método de adiciones estándar. Se colocan 20.0 mL acetato de amonio 0.1 mol/L en $\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$ 80:20, como electrolito soporte. Se burbujea N_2 durante 5 minutos para desplazar el oxígeno retenido por los disolventes y sólo después de ello se traza la curva I_p-E . Se hacen 3 adiciones sucesivas de la muestra caléndula comercial de aproximadamente 100 μL , se traza el polarograma diferencial de impulsos tras cada adición. Se hacen posteriormente tres adiciones de quercetina 0.009 mol/L de 50 μL y tres adiciones de 30 μL ; se trazan los polarogramas tras cada adición.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Valoración por retroceso de quercetina + NaOH con HCl 0.01 mol/L

A la alícuota de 5.0 mL de quercetina se le agregan 45.00 mL de NaOH 0.009 mol/L, y se valora con HCl 0.01 mol/L, obteniendo el siguiente gráfico:

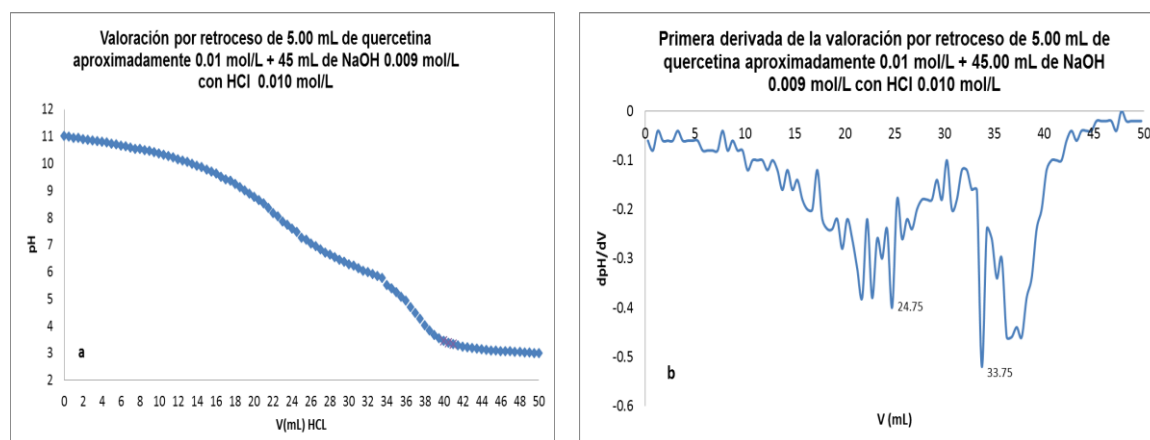


Figura 7. a) Curva de valoración por retroceso de quercetina y un exceso de NaOH con HCl 0.01 mol/L; **b).** Primera derivada de la valoración por retroceso de quercetina con HCl 0.01 mol/L.

En esta curva de valoración se observan dos puntos de equivalencia, el primero de ellos se debe al exceso de NaOH agregado y el segundo corresponde a la quercetina.

El primer punto de equivalencia se encuentra en 24.75 mL y el segundo en 33.75 mL, determinados tanto en la curva logarítmica como por la primera derivada. El primer punto de equivalencia, permite determinar la concentración de hidróxido de sodio agregado en exceso y que no reaccionó con la quercetina; con el segundo punto de equivalencia los grupos fenol de la misma, previamente neutralizados con NaOH. El pka experimental encontrado para estos protones ácidos de la quercetina es de 6.0. En la tabla 2 se puede visualizar los resultados señalados y la concentración encontrada para la quercetina.

Tabla 2. Milimoles obtenidas de quercetina en la valoración por retroceso de quercetina con 45.0 mL de NaOH con HCl 0.01 mol/L

mmol originales de NaOH 0.009 mol/L adicionados	mmol detectados por la valoración con HCl 0.01 mol/L en el primer punto de equivalencia	mmol detectados de quercetina
45.0 mL X 0.009 mol/L = 0.40 mmol	24.75 mL X 0.01 mol/L = 0.2475 mmol	33.75mL (punto de equivalencia 2)-24.75(punto de equivalencia 1) = 9.0 mL 9.00 mL X 0.01 mol/L = 0.09 mmol de quercetina, ya que en el primer punto se detecta el exceso de NaOH. Ahora, los milimoles encontrados en el volume de alícuota nos da la concentración experimental de la quercetina 0.09 mmol/ 5.00 mL(alícuota de quercetina)= 0.018 mol/L 0.018/2 = 0.009 mol/L

La concentración experimental de quercetina determinada es de 0.018 mol/L mientras que la teórica era de 0.01 mol/L, es decir, 1.8 veces más. Esto se puede explicar de la siguiente manera: dos grupos OH de la quercetina están siendo valorados juntos, es decir los protones más ácidos. De ahí que, tenemos que $0.018 / 2 = 0.009 \pm 2.64 \times 10^{-5}$ mol/L y por lo tanto la pureza de la quercetina es del 90.0%.

De acuerdo con la estructura de la quercetina, ésta tiene 5 grupos OH (Figura 8); sin embargo, se detectan solo 2 mediante la valoración potenciométrica, lo cual se atribuye a la fuerza de dichos protones. De los dos grupos OH que están en posición orto en el anillo B, sólo uno es más ácido y es el de la posición C-4' respecto al del C-3'; debido a la formación de mayor número de híbridos de resonancia, lo cual estabiliza a la molécula sin dicho protón, esto lo hace más ácido (Fig. 9). Por otra parte, el OH del anillo A en la

posición C-7, experimenta el mismo fenómeno que el de la posición 4' del anillo B, de ahí que sea más ácido que el de la posición C-5 del anillo A y por ello pueden ser los dos protones detectados.

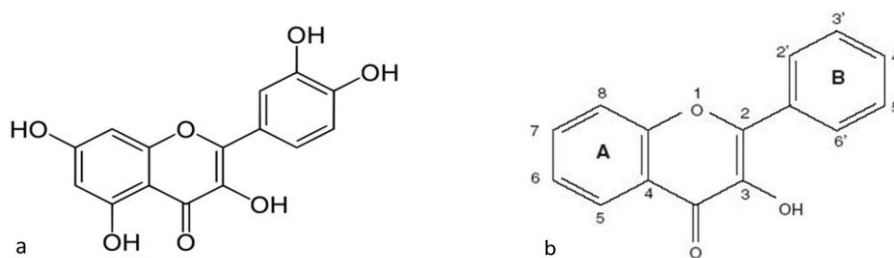


Figura. 8 a) Estructura de quercetina; b) Anillos A, B y C en los flavonoides y numeración de los carbonos

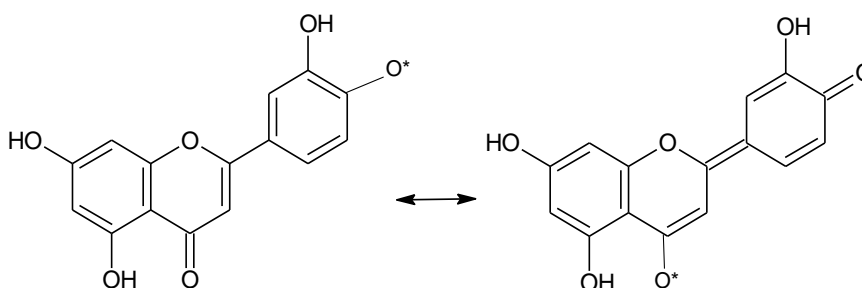


Figura. 9 Estructuras de resonancia que muestran la estabilización de la molécula sin el H del C 4'.

Mediante esta valoración se obtuvo la concentración de la quercetina que resultó ser de 0.009 mol/L. Durante la valoración pH métrica la coloración amarilla de la quercetina se intensifica.

5.2 Pruebas cualitativas de complejación con quercetina

Una vez realizadas las pruebas a la gota, se obtienen los siguientes resultados que se muestran en la tabla número 3. La quercetina en disolución presenta un color amarillo intenso.

Tabla 3. Resultados de la complejación positiva de quercetina con algunos cationes metálicos.

Catión metálico	Resultado de Complejación
CuCl ₂ 1.03 X 10 ⁻² mol/L en ETOH-H ₂ O 1:1 (azul ténue). Medio ácido y neutro	Positiva. Cambia de color a amarillo quemado intenso, aparece precipitado.
FeCl ₃ + 6H ₂ O 1 X10 ⁻² mol/L en ETOH-H ₂ O (anaranjado-rojizo). Medio pH=7.0 y 4.0	Positiva. Cambia de color de anaranjado a café oscuro
FeCl ₂ + 4H ₂ O 1 X10 ⁻² mol/L en ETOH-H ₂ O 1:1, (amarillo ténue)	Positiva. Color verde olivo oscuro
Pb(NO ₃) ₂ 1X10 ⁻² mol/L EN ETOH-H ₂ OH	Positiva. Amarillo intenso, mucho más intenso el tono inicial.
Cu(NO ₃) ₂ + 2.5 H ₂ O.03 X 10 ⁻² mol/L EN ETOH-H ₂ O 1:1 (azul ténue)	Positiva. Soln. amarillo intenso con precipitado, mucho más intenso el color del complejo que del ligando solo.
Cr(NO ₃) ₃ 0.05 mol/L EN MEOH azul verdoso claro. Medio ácido	Positiva. Disoln. amarilla intensa, mucho más intenso el color del complejo que del ligando solo.
CuSO ₄ 9X10 ⁻² mol/L (azul turquesa) Medio ácido y neutro	Positiva. Se forma una solución verdosa
ZnCl ₂ Medio ácido	Positiva Cambia a color amarilla intensa, mucho más intenso el color del complejo que del ligando solo.
Ni(II). Disolución azul-verdoso	Positiva. Disoln. amarillo intensa, mucho más intenso el color del complejo que del ligando solo.
BaCl ₂ Medio ácido	Positiva. Disoln. amarilla intensa, mucho más intenso el color del complejo que del ligando solo.

Los trabajos de (Viswanathan, Sriram, Yugeeswaran, 2000 y Leopoldini 2006) muestran que los flavonoides que contienen los grupos OH en la posición 3 y posición 5 son muy susceptibles de complejar a diversos cationes, debido a la formación de anillos de 5 y 6 miembros con el catión metálico, por lo cual son reacciones muy favorecidas. En el caso de quercetina que presenta ambos OH's resulta cierta tal aseveración. En el caso de Crisina que no presenta el OH en posición 3 no vemos la formación de complejos con Cu²⁺.

La literatura señala la capacidad de la quercetina de complejar a cationes en medio ácido y con este experimento podemos corroborar dicha información, (Ruíz y Ramírez, 2012).

5.3 Estandarización de CuCl₂ disuelto en una mezcla de EtOH/H₂O 80:20, mediante polarografía diferencial de impulsos (PDI), utilizando cobre electrolítico, método de adiciones patrón.

Se hacen tres adiciones de CuCl₂ de 50 µL cada una, utilizando buffer de ácido acético/acetato de pH 5.0, como electrolito soporte; se trazan los polarogramas correspondientes, se observa un aumento lineal de la señal de *ip* con la concentración (figura 10, polarogramas B, C y D).

Posteriormente se adiciona el Cu^{2+} electrolítico (estándar interno), se hacen cinco adiciones y se mide la intensidad de pico (i_p). Se observa nuevamente un aumento lineal de la i_p con la concentración (figura 10, polarogramas del E al I).

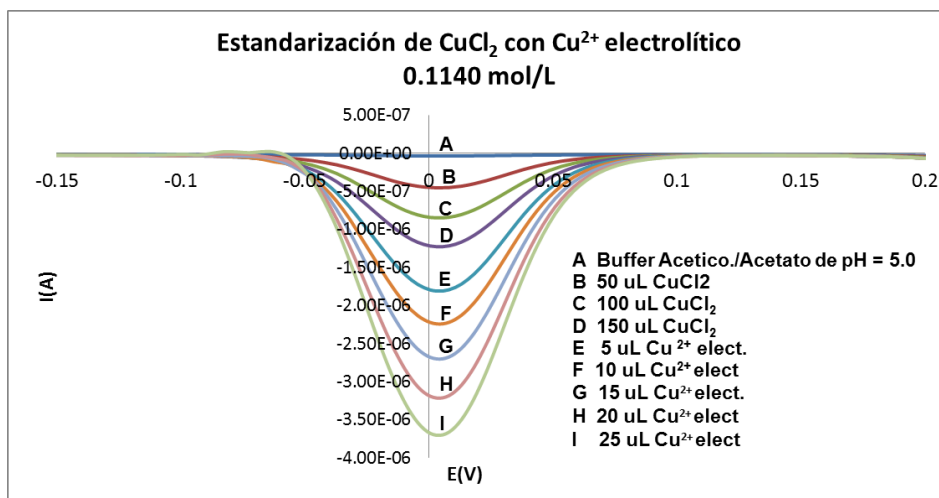


Figura 10. Determinación de la concentración de CuCl_2 mediante polarografía diferencial de impulsos, por el método de adiciones estándar.

En los polarogramas de la figura 10 se observa que el Cu^{+2} del CuCl_2 , presenta una señal en 0.008 V. Tras las adiciones de cobre electrolítico se observa la señal en el mismo potencial. El cobre electrolítico es de alta pureza y nos sirve como estándar para cuantificar el CuCl_2 . La señal observada en los polarogramas es una señal de reducción del Cu^{+2} . La i_p del Cu^{+2} se grafica posteriormente en el eje de las ordenadas y la concentración en las abcisas. Como se conoce la concentración del estándar y su intensidad de pico, se puede conocer la concentración de la muestra problema.

A continuación se presentan los datos de las adiciones sucesivas de estándar de Cu^{+2} electrolítico y su respectiva intensidad i_p .

Tabla 4. Intensidad de corriente para la señal de 0.008 V correspondiente a Cu^{2+} electrolítico

Volumen añadido Cu^{2+} electrolítico (μL)	Micromoles de Cu^{2+} electrolítico	Intensidad (μA)
0	0	1.21
5.0	0.57	1.79
10.0	1.14	2.22
15.0	1.71	2.68
20.0	2.28	3.2
25.0	2.85	3.71

Al graficar los datos anteriores se obtiene:

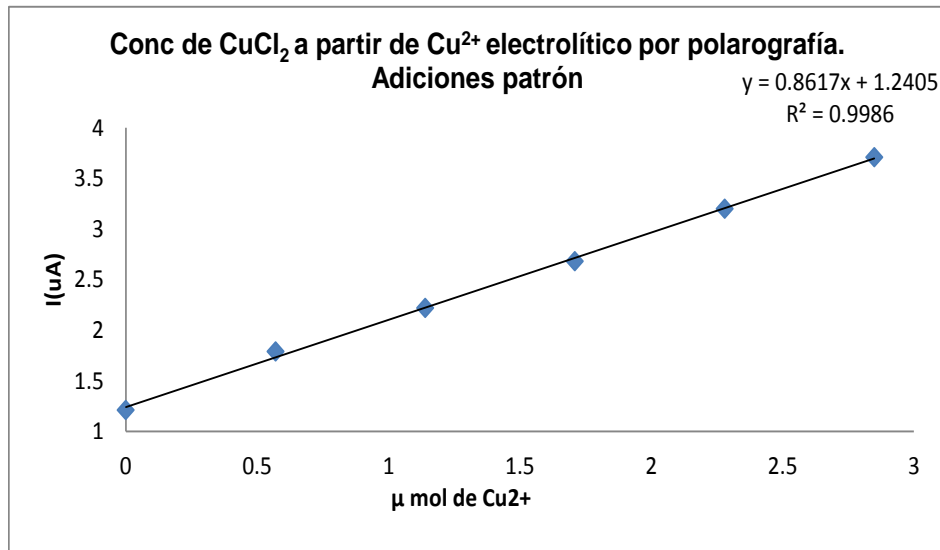


Figura 11. Adiciones patrón de Cu²⁺ electrolítico a una muestra de CuCl₂ de concentración desconocida.

La recta de regresión determinada, se extrapola al punto del eje x donde $y = 0$. El método de adiciones estándar resulta especialmente útil para los casos en que la composición variable de las muestras desconocidas, hace difícil la preparación de patrones con la misma matriz de las muestras.

De acuerdo con la figura 11, si $y = 0$ $x = 1.4396 \mu\text{mol de Cu}^{2+}$, en una alícuota de 150 μL , por lo tanto la concentración de CuCl₂ es igual a $0.0096 \pm 7.07 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. El límite de detección encontrado para el Cu²⁺ es de 8.36 ppb, determinado como $\text{LDD} = 3S \text{ i/c} / \text{m}$.

5.4 Estudio electroquímico fundamental de quercetina, mediante polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos.

5.4.1 Polarografía clásica

El estudio por polarografía clásica utilizando acetato de amonio 0.1 mol/L en EtOH-H₂O 80:20 como electrolito soporte permite obtener un dominio de electroactividad de -1.8 V hasta 0.2 V vs. Ag/AgCl/KCl. A continuación se puede observar el polarograma del electrolito soporte o zona de electroactividad y la polarografía clásica de quercetina 0.009 M.

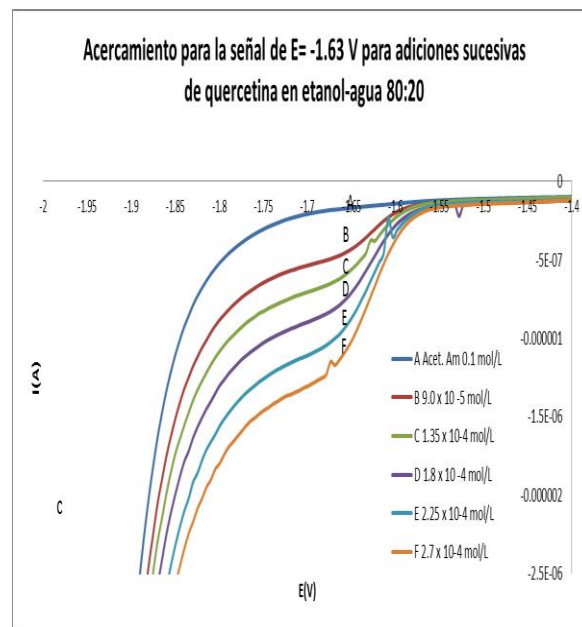
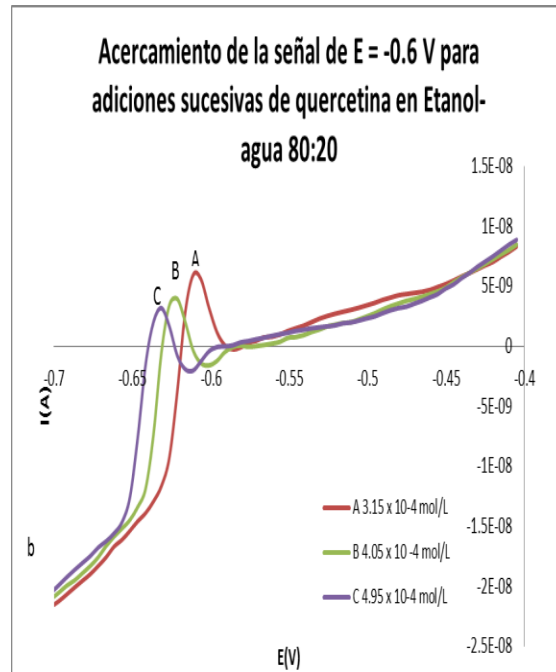
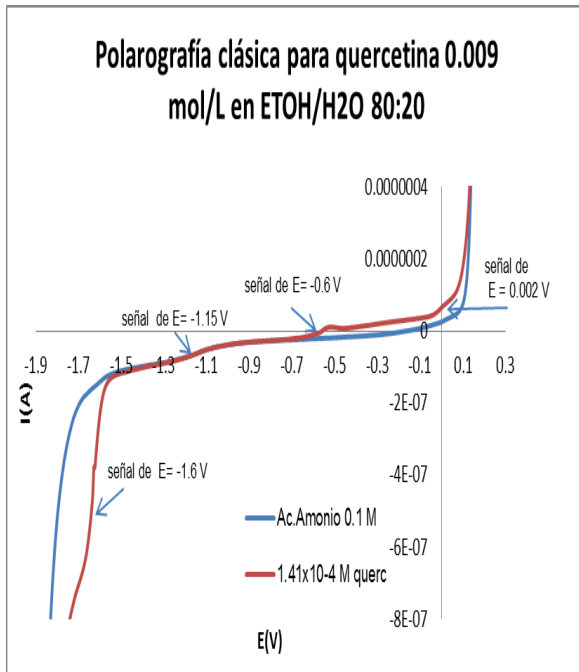


Figura 12a. Zona de electroactividad utilizando acetato de amonio 0.1 mol/L como electrolito soporte en etanol-H₂O 80:20 y la polarografía clásica de quercetina 0.009 mol/L. **Figura 12b.** Muestra un acercamiento a la señal de E = -0.6 V. **Figura 12c.** Acercamiento a la señal de E = -1.63 V para adiciones sucesivas de quercetina 0.009 M. Se emplea un sistema de tres electrodos: trabajo EGM, referencia: Ag/AgCl/KCl y Pt como electrodo auxiliar.

Mediante la polarografía clásica de la quercetina se observan tres señales de reducción y una de oxidación, trabajando en el sistema de disolventes mencionado, y acetato de amonio 0.1 mol/L como electrolito soporte.

Tabla 5. Señales observadas para la polarografía clásica de quercetina 0.009 M

Señal 1 oxidación	Señal 1 de reducción	Señal 2 de reducción	Señal 3 de reducción
0.002 V	-0.6 V	-1.15 V	-1.6 V

Dado que la señal de -1.6 V crece proporcionalmente a la concentración de quercetina o es dependiente de la concentración de la misma, se realiza un estudio logarítmico para obtener el $E_{1/2}$ y el número de electrones intercambiados. Esta señal de reducción de quercetina posee la mayor intensidad de corriente en todo el intervalo de concentraciones trabajado, como se puede observar en el polarograma de la figura 12c. La señal cercana a $E = -0.6$ V no es una señal que crezca proporcionalmente con la concentración, es una señal de adsorción.

Las reacciones propuestas de oxidación y reducción de la quercetina son las siguientes:

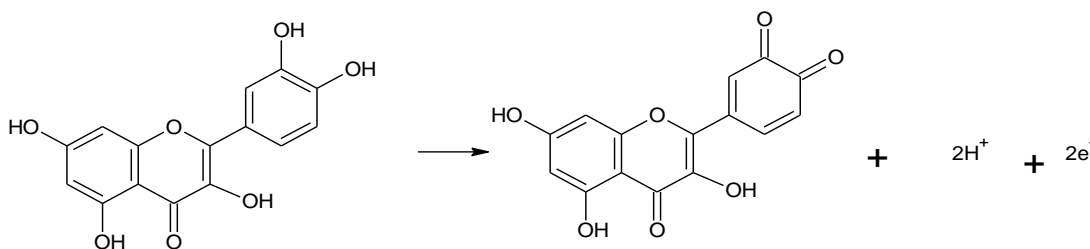


Figura 13. Posible reacción de oxidación de quercetina.

La reacción de oxidación implica la formación de la quinona. Por otra parte, una de las reacciones de reducción propuesta es la que se observa en la figura 14.

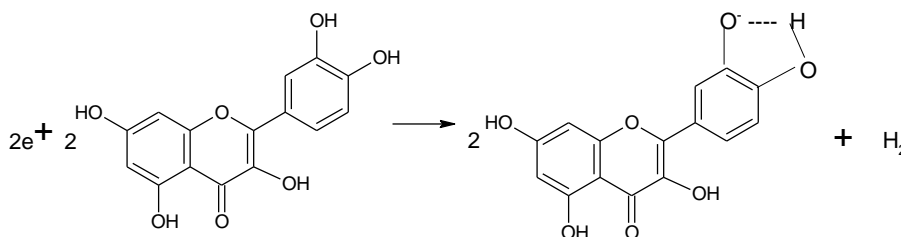


Figura 14. Reacción de reducción de quercetina.

Las otras dos reacciones de reducción de la quercetina son para el carbonilo del anillo de la pirona y el OH del carbono 3 en el anillo C, por último, la reducción del carbonilo de la pirona junto al OH del carbono 5 del anillo A.

Estudio logarítmico y gráfico de Tafel

Al hacer el estudio logarítmico de la señal de $i_p = -1.63$ V para la quercetina, se obtiene lo siguiente:

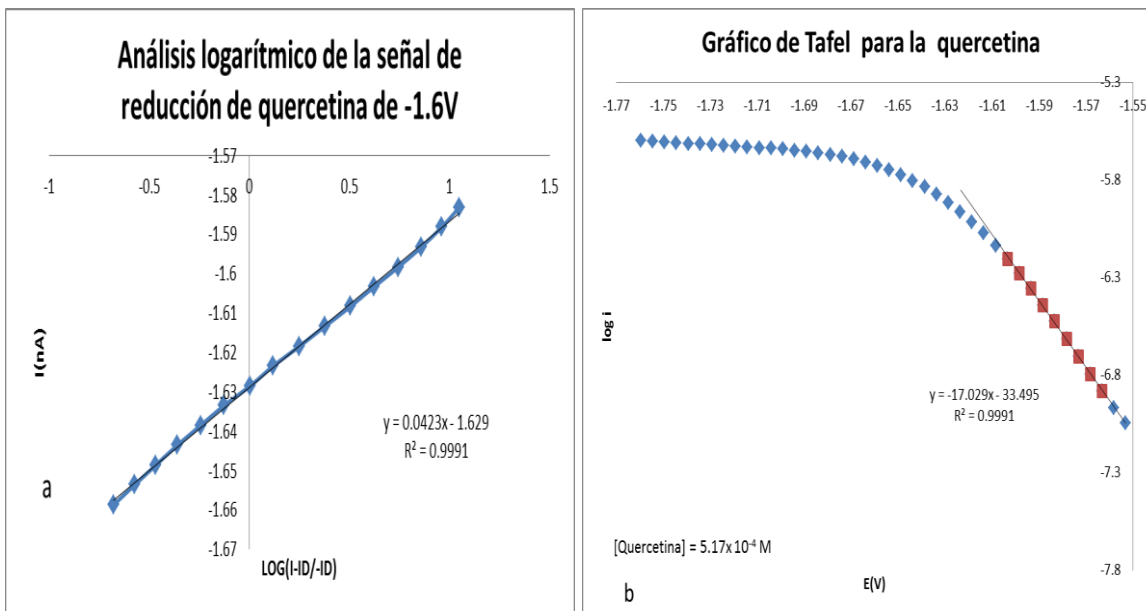


Figura 15 a). Estudio logarítmico de la señal de reducción de quercetina de -1.63 V, b) gráfico de Tafel para la señal de -1.63 V de quercetina en etanol-agua 80:20.

El valor de la ordenada al origen para el análisis logarítmico (Anexo 1) indica que la señal 3 de reducción posee un $E_{1/2} = -1.63$ V, el valor de la pendiente es de 0.0426, por lo tanto, se intercambia más de 1 electrón. Estos resultados acerca del intercambio de más de un electrón se corroboran por otros estudios sobre quercetina realizados en el mismo laboratorio donde se ha encontrado intercambio de dos electrones para la quercetina (Martínez, 2016).

Se realiza el estudio logarítmico para verificar la idealidad del sistema electroquímico con la ecuación de Nernst y a su vez se aplicó el modelo de Tafel para evaluar su reversibilidad, (ver figura 15 b), de acuerdo con ésta figura se obtienen los siguientes parámetros del sistema redox según la ecuación de Tafel.

Tabla 6. Parámetros de la ecuación de Tafel para la reducción de quercetina a $E = -1.63$ V

Parámetro	Valor
Log i_0	7.1
i_0	7.9×10^{-8} A
m	-17.029
αn	1.006
α (si n fuera 2)	0.503

El gráfico de Tafel es una representación de la ecuación de Tafel:

$$\log i = \log i_0 - (\alpha n F / 2.3 RT) \eta$$

Donde η es el sobrepotencial, i es la corriente de intercambio que representa la corriente que se transfiere al potencial de equilibrio (E_{eq}). Como rara vez se conoce el sobrepotencial, es posible representar gráficamente $\log i$ vs E , obtenidos ambos valores de las curvas i vs E . El trazo del gráfico de Tafel es una herramienta que se utiliza para evaluar parámetros cinéticos. Donde $m = -\alpha n F / 2.3 RT$ (Bard, 1980) para la zona catódica, α es el coeficiente de transferencia de carga.

En el caso de la quercetina se obtiene un valor de $\alpha n = 1.0061$ y como el número de electrones intercambiados es mayor a 1 (de acuerdo con el valor de la pendiente del estudio logarítmico $m = 0.0423$), entonces α va a ser menor a 1.0061, si se tratara de 2 electrones, α es de 0.503. La i_0 para éste caso es de 7.9×10^{-8} A. (Ver anexo 2).

Se determina la K° con los datos de las gráficas de Tafel a diferentes concentraciones de quercetina (Anexo 5) y se encuentra un valor de K° del orden de $10^{-5.0}$ cm/seg, por lo que se trata de un sistema moderadamente lento.

Se hace también el estudio logarítmico para la señal que se encuentra cercana a -1.2 V y se obtiene que no presenta comportamiento lineal. El $E_{1/2}$ onda probable es de -1.15 V. Por lo que se cree se trata de una señal no nerstiana.

La señal de reducción de -0.5 V y la señal de oxidación de 0.002 V no presentan comportamiento lineal, al menos bajo éstas condiciones de trabajo.

5.4.2 Polarografía diferencial de impulsos (PDI)

Se trazaron las curvas i_p vs E por polarografía diferencial de impulsos a diferentes concentraciones de quercetina en disolución, ésta es una técnica de mayor sensibilidad que la polarografía de barrido lineal, debido a que durante el tiempo de vida de cada gota, se llevan a cabo dos medidas de corriente, una antes de aplicar el impulso (τ') y la otra casi al final del impulso (τ), antes de que caiga la gota, se registra la diferencia de intensidades $i(\tau') - i(\tau)$ frente al potencial.

Se procedió a determinar la existencia de relación lineal para las diferentes señales de quercetina y reconocer así, los procesos gobernados por difusión, donde la Intensidad es directamente proporcional a la concentración.

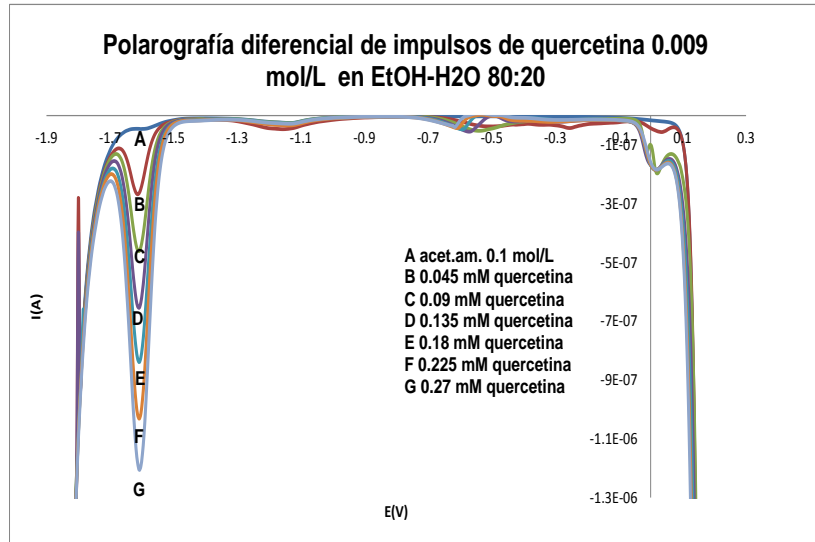


Figura 16 Polarografía diferencial de Impulsos para quercetina 0.009 mol/L en etanol-H₂O

Para verificar la dependencia de la intensidad de corriente para cada señal respecto a la concentración de quercetina, se procedió a graficar los valores de la intensidad de corriente respecto a la concentración, a partir de los cuales se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Se encontró en el presente trabajo, que bajo éstas condiciones, sólo la señal de -1.63 V vs. Ag/AgCl es directamente proporcional a la concentración

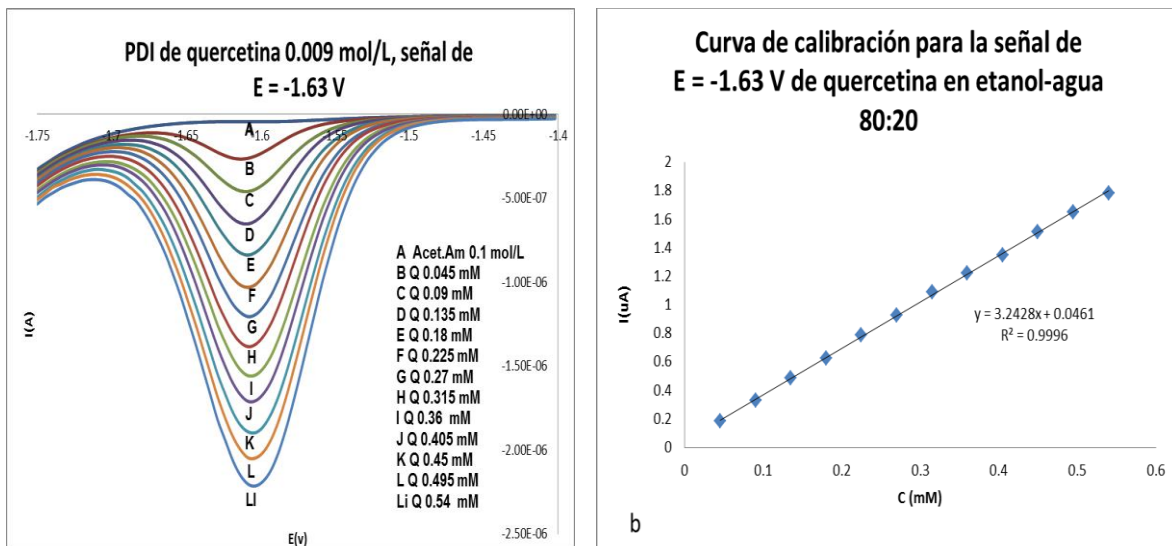


Figura 17. a) PDI para la señal de quercetina 0.009 mol/L de E = -1.63 V vs Ag/AgCl, b) Curva de calibración para la señal de -1.63 V de quercetina en EtOH-H₂O 80:20,

El límite de detección encontrado para la quercetina es de 3.23 ppm ó una concentración de quercetina de $1.1 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$ mol/L, el límite de detección se calcula como $LDD = 3S_{i/c} / m$. (Anexo 3).

La señal de reducción de -1.15 V no presenta comportamiento lineal respecto a la concentración, al menos en este medio.

De acuerdo con estos resultados, la señal de reducción de -1.63 V puede ser usada en la determinación cuantitativa de quercetina en muestras comerciales de caléndula.

5.5. Estudio electroquímico de la formación de complejos de quercetina con Cu (II). Valoraciones complejométricas

Se lleva a cabo la complejación de quercetina, para ello se parte de 500 μ L de quercetina 0.009 mol/L, en 20.0 mL de electrolito soporte, que es una disolución de acetato de amonio 0.1 mol/L.

Durante la valoración de quercetina con Cu(II), adicionado como CuCl_2 0.0096 mol/L, desaparece primero la señal de oxidación de quercetina de 0.002 V, desaparece también la cercana a -0.5 V y la señal de -1.63 V que era controlada por difusión, esta última empieza a disminuir conforme se va adicionando más Cu(II) (figura 18).

Por otra parte, aparecen dos señales tras cada adición de Cu(II), debidas al cobre, una en -0.27 V y otra en -0.13 V. Finalmente, aparece una tercera señal en 0.0079 V que se puede deber al complejo

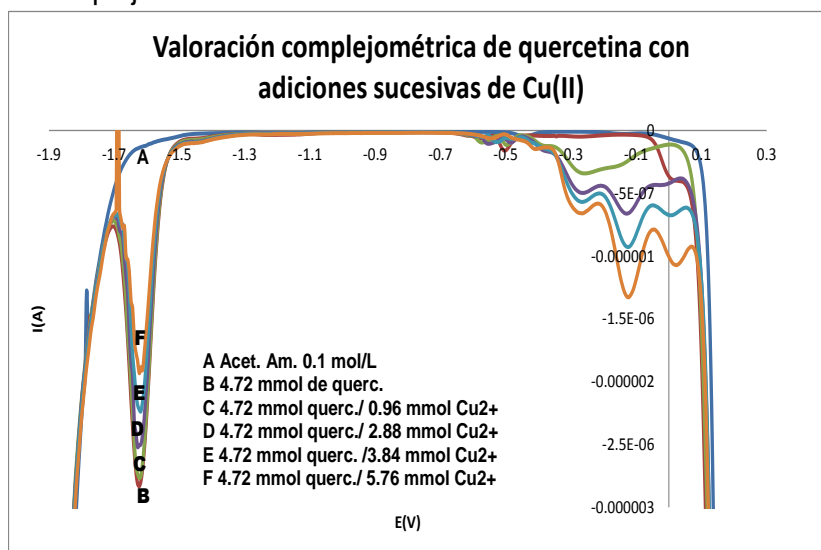


Figura 18. Polarograma que muestra el efecto de la valoración de quercetina con Cu(II).

Se puede observar en la figura 18, que las señales que se forman tras la adición de cobre (II) crecen proporcionalmente a las adiciones del catión, por lo que se atribuyen al Cu (II) y la de 0.0079 V al complejo.

Para la determinación de las estequiometrías de los complejos formados en la valoración de quercetina con Cu(II), primero se evalúa la señal de -1.63 V, señal de quercetina que es proporcional a la concentración, luego la señal de 0.0079 V que se atribuye a un complejo y por último la de -0.13 V, (figuras 19 a, 19 b y 19 c).

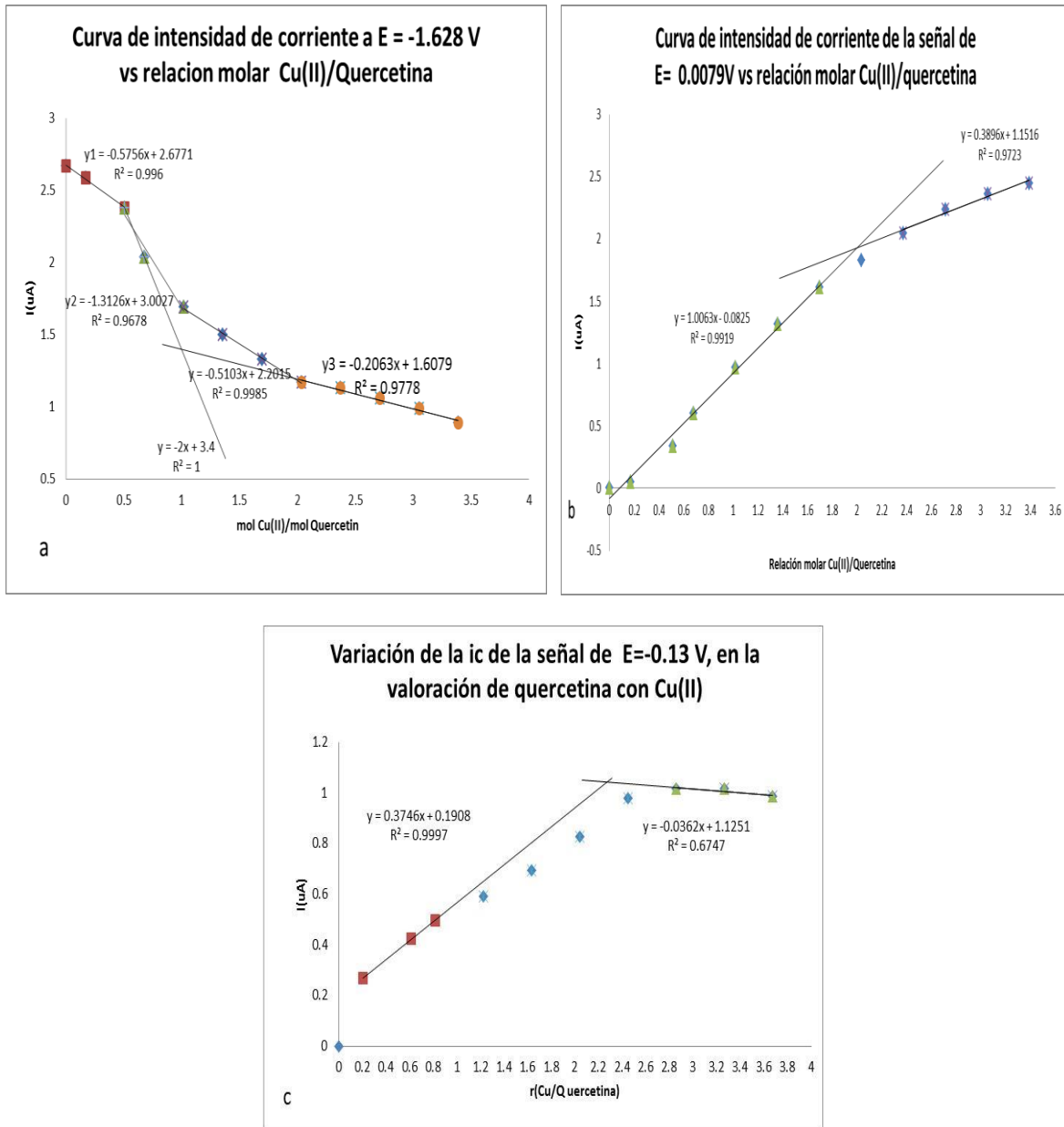


Figura 19 a) Señal de $E = -1.63 \text{ V}$ de quercetina vs relación molar Cu(II)/quercetina , b) Señal de $E = 0.0079 \text{ V}$ vs. $r \text{ Cu(II)/quercetina}$ y c) Señal de $E = -0.13 \text{ V}$ vs $r \text{ Cu(II)/quercetina}$.

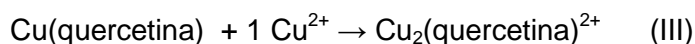
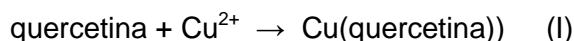
Al graficar la variación de la corriente i_p de la señal de $E = -1.63 \text{ V}$ en función de la relación molar Cu(II)/quercetina , se obtiene una disminución de intensidad de la señal a medida que se adiciona el catión metálico y se observan un cambio de pendiente en r (Cu/quercetina) de 0.5, por lo que se tiene el complejo 1 metal-2 ligante, correspondiendo así al complejo $[\text{Cu}(\text{quercetina})_2]^{2-}$. También hay un segundo cambio de pendiente en $r = 1.0$, por lo que tenemos al complejo 1 metal-1 ligante, $\text{Cu}(\text{quercetina})$ y finalmente se ve un cambio de pendiente en $r = 2.0$ por lo que se puede tener el complejo 2 metal-1 ligante, $[\text{Cu}_2(\text{quercetina})^{2+}]$. Estas estructuras son propuestas en base al pH de trabajo, ya que éste es de 7.5 por lo que creemos que la quercetina está desprotonada, dado el pKa de

alrededor de 6.0 encontrado experimentalmente para la quercetina y reaccionaría con Cu^{2+} formando un primer complejo neutro, cuando se forma el complejo $[\text{Cu}_2(\text{quercetina})^{2+}]$, éste sí tendría carga positiva.

Algunos trabajos anteriores (Leopoldini M. and et. al., 2006) señalan que las estequiometrías que encontraron para los flavonoides con metales de transición (Cu(II) , Fe(III)) es de 1:1, 1:2, 2:2, 2:3 relación de metal/flavonoide). Nosotros encontramos el complejo ML, 1 de metal- 1 de flavonoide y 1 de flavonoide - 2 de metal, así como 2 de flavonoide y uno de metal.

Al analizar la señal de 0.0079 V que atribuimos al complejo (figura 19 b), hay un cambio de pendiente marcado en $r = 2.2$ correspondiendo al complejo $(\text{Cu}_2(\text{quercetina}))^{4+}$.

Los equilibrios de complejación propuestos son:



Estos son los complejos encontrados cuando se adiciona Cu(II) como cloruros a una solución conteniendo quercetina. El que se forme el complejo ML ó ML_2 , está influido por las condiciones de síntesis del complejo, ya que si la concentración de Cu(II) es alta, se desplaza el equilibrio de ML a M_2L , si por el contrario la concentración de quercetina es mayor que la del Cu(II) se puede llegar a obtener el complejo ML_2 . Los complejos obtenidos pueden presentar carga positiva, como lo encontró también Leopoldini, 2006. El $\log K_{\text{fg}}$ o $\log \beta$ para los complejos ML_2 es de 7.08, para ML es de 4.94 y para M_2L es de 10.03, valores determinados a partir de éstos resultados experimentales por polarografía diferencial de impulsos. (Ver Anexo 4).

5.6. Estudio electroquímico de la formación de complejos de Cu (II) con quercetina. Valoraciones complejométricas

Se adicionan 300 μL de CuCl_2 0.0096 mol/L, mediante tres adiciones sucesivas de 100 μL cada una de ellas, a una celda polarográfica que contenía 10.00 mL de electrolito soporte acetato de amonio 0.1 mol/L, la cual fue sometida a 5.0 minutos de burbujeo con N_2 . Obteniéndose así el polarograma de la figura 20.

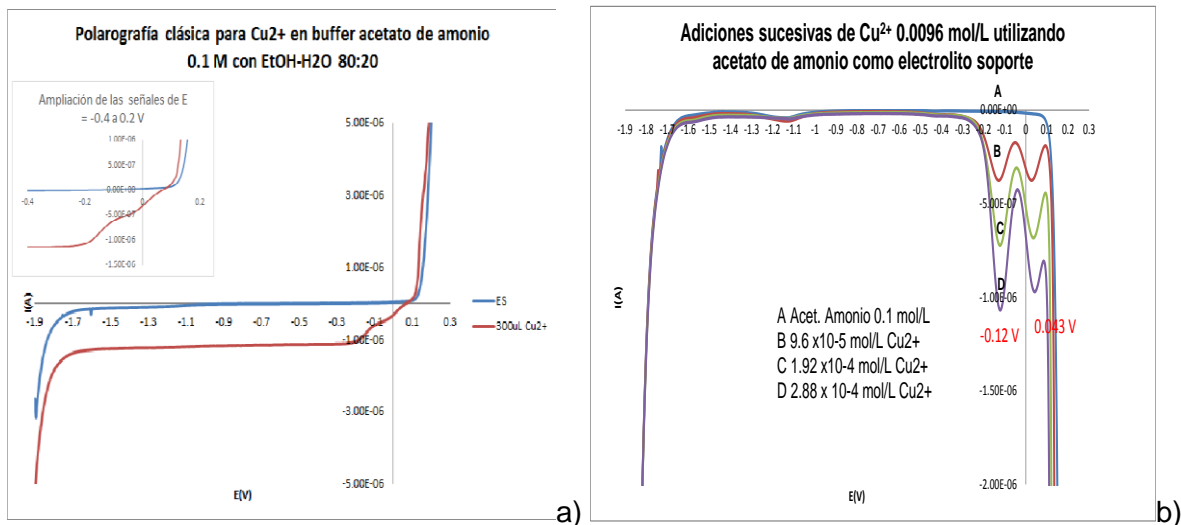


Figura 20 a) Polarografía clásica de 300 μL de Cu^{2+} 0.0096 mol/L b) Polarografía diferencial de impulsos de 300 μL de Cu^{2+} 0.0096 mol/L, en ambos casos se utiliza acetato de amonio 0.1 mol/L como electrolito soporte.

En la figura 20 a y 20 b se observan dos señales, como se puede observar son dos señales de reducción para el cobre, la primera en -0.123 V y la segunda en 0.043 V, en éstas condiciones; en la figura 21b se puede observar que ambas señales aumentan con la concentración, si se grafica i vs concentración se observa un comportamiento lineal. Posteriormente, se añade alícuotas de quercetina 0.009 mol/L las dos señales de cobre empiezan a decrecer y aparece una tercera señal cercana a -0.25 V (ver figura 21a), que se debe al complejo.

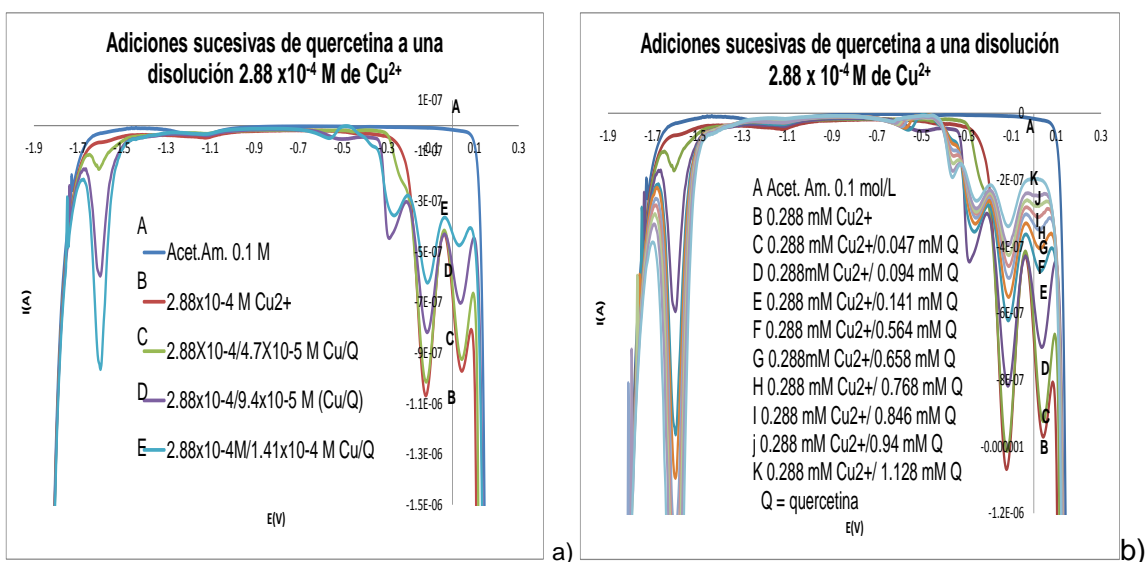


Figura 21. a) Adiciones sucesivas de quercetina a una disolución de 2.88×10^{-4} mol/L de Cu^{2+} , formación de una primera señal debida al complejo b) Formación de una segunda señal de complejación de quercetina con Cu^{2+}

En la figura 21 a) se puede observar que desde la primera adición de quercetina (4.7×10^{-5} mol/L) aparece la señal cercana a un $E = -0.25$ V vs Ag/AgCl y que la señal previamente determinada para quercetina en -1.63 V vs. Ag/AgCl, aumenta proporcionalmente tras adiciones de la misma.

Finalmente, después de haber alcanzado la relación estequiométrica 1:1 se empieza a formar una segunda señal presumiblemente de complejación en $E = -0.36$ V, que se observa en la figura 21 b. Al ir monitoreando la disminución de la intensidad de corriente para las señales de cobre, después de adicionar quercetina, se tiene:

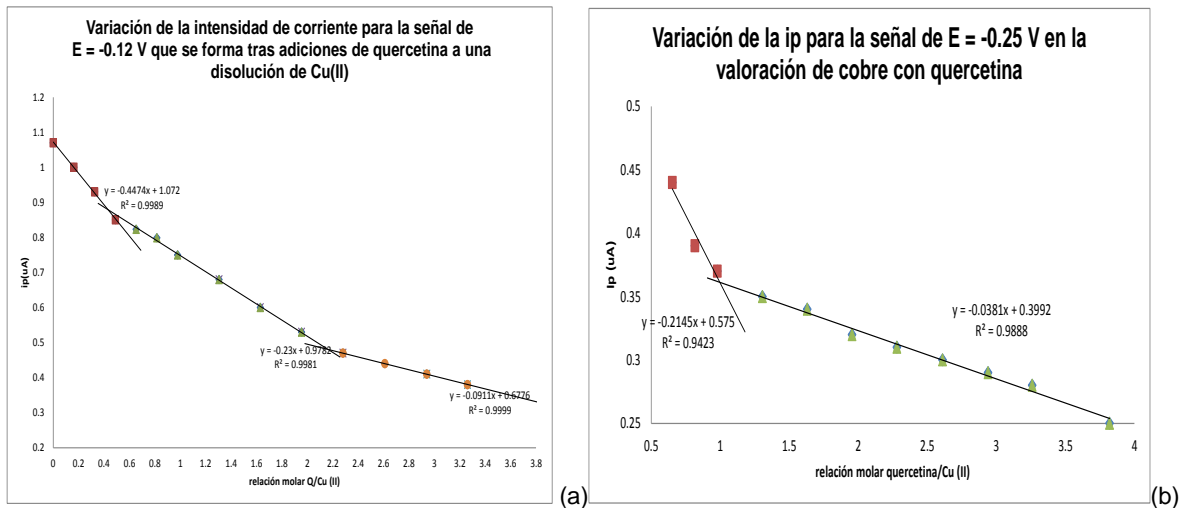
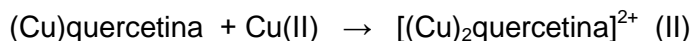
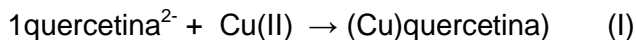


Figura 22. a) Disminución de la intensidad de corriente para la señal de Cu (II) de $E = -0.12$ V, respecto a la relación molar quercetina/Cu(II), b) Variación de la intensidad para la señal que aparece en -0.2538 V en la valoración de Cu(II) con quercetina.

Se observa (figura 22 a) que se da un cambio de pendiente en una r (relación mol quercetina cobre) de 0.5 que nos indican la relación estequiométrica del complejo formado, en éste caso tenemos al complejo 1 quercetina: 2Cu(II). Durante la valoración por lo tanto, se lleva a cabo el siguiente equilibrio:



La formación de éste primer complejo (formado en el equilibrio II) es lógico observarla, dado que se tiene alta concentración de cobre en la celda, por ello la relación estequiométrica es 2:1 respecto a quercetina, las condiciones experimentales permiten que el equilibrio (II) se lleve a cabo cuando hay exceso de cobre. Al pH de trabajo (7.5) el 90% de quercetina puede estar desprotonada como Q^{2-} y al reaccionar da lugar a un primer complejo Cu(quercetina) que podría ser neutro; por las condiciones experimentales este primer complejo reacciona con más cobre y se forma el complejo $[\text{Cu}_2(\text{quercetina})]^{2+}$. Para determinar si el complejo presenta carga o no, se tendría que hacer experimentos

adicionales, que no los realicé por no estar dentro del objetivo del presente trabajo, las estructuras propuestas son en base al pH de trabajo.

La disminución de la intensidad de corriente en las figuras 22 a y 22 b se debe a que es una de las señales del cobre y marca como va disminuyendo tras las adiciones de quercetina. Al estudiar, por otra parte, la variación de la intensidad de corriente (i_p) de la señal de $E = -0.25$ V atribuida a uno de los complejos se obtiene la gráfica mostrada en la figura 23b, donde se observa un cruce de las líneas en 0.9 que nos representa la relación estequiométrica muy cercana a 1 de quercetina: 1 Cu(II). Por lo que ésta señal podría ser la del complejo ML.

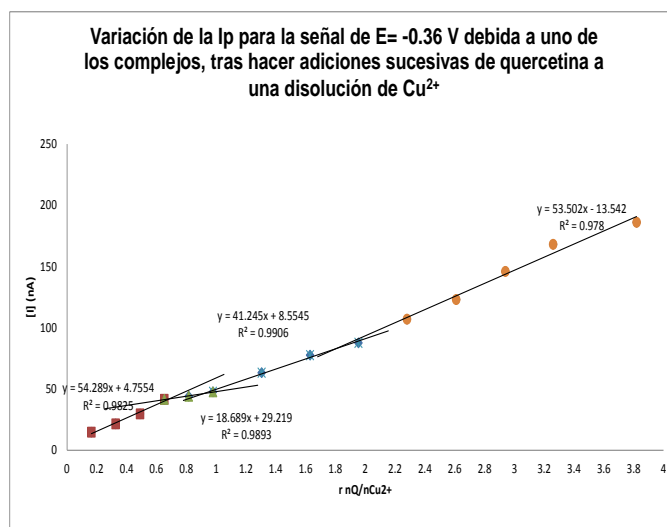
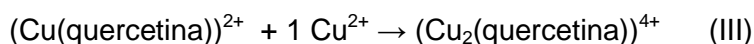
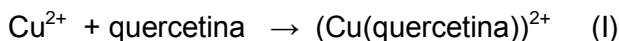


Figura 23. Señal de $E = -0.36$ V atribuida a uno de los complejos, formados al valorar una disolución de cobre con quercetina.

La última señal analizada en éste experimento es la de -0.36 V, al graficar la variación de la intensidad i_p de dicha señal vs $r(\text{quercetina}/\text{Cu}^{2+})$ se observa un cruce de las rectas en 0.6 (figura 23), que corresponde a la estequiometría 2 mol quercetina: 1 mol de cobre. Luego se observa otro cambio de pendiente con cruce de las rectas en 0.8, correspondiente al complejo ML y finalmente un tercer cruce de rectas en 1.8 correspondiente al complejo ML_2 , este complejo (ML_2) también fue observado por (Ruíz P. y Ramírez S., 2012).

Por lo que los equilibrios propuestos son:



Aquí se vuelve a observar que del complejo ML se puede pasar al ML_2 , si las condiciones experimentales llevan un exceso de L. Los complejos formados en los experimentos 5.5 y

5.6 se resumen en la tabla 7. Es probable que cada uno de los complejos formados presenten la carga del Cu^{2+} .

Tabla 7. Complejos formados entre Cu^{2+} -quercetina mediante polarografía diferencial de impulsos (PDI)

Complejación de quercetina con Cu(II)	Complejación de Cu(II) con quercetina
2 mol de quercetina: 1 mol de Cu(II), $[\text{Cu}(\text{quercetina})_2]^{2-}$ o ML_2	2 mol de Cu(II): 1 mol de quercetina, $[\text{Cu}_2(\text{quercetina})^{2+}]$ o M_2L
1 mol de Cu(II): 1 mol de quercetina, es decir $\text{Cu}(\text{quercetina})$ ó ML	1 mol de quercetina: 1 mol de Cu(II) $\text{Cu}(\text{quercetina})$ ó ML
2 mol de Cu: 1 mol de quercetina, $[\text{Cu}_2(\text{quercetina})^{2+}]$ ó M_2L	2 mol de quercetina: 1 mol de Cu(II) $[\text{Cu}(\text{quercetina})_2]^{2-}$ ó ML_2

Con ambos experimento se corroboran, al menos las estequiometrías, 1:1, y 1:2 para el complejo metal/quercetina, de Leopoldini et al, 2006. En nuestra investigación obtenemos evidencia del complejo M_2L , ML y ML_2 en las condiciones de trabajo empleadas.

Las constantes de formación globales para los complejos ML y ML_2 son: $\log \beta = 4.94$ y $\log \beta = 7.08$, para M_2L es de 910.03; valores determinados a partir de los resultados de la variación de la intensidad de corriente por polarografía diferencial de impulsos del presente trabajo. (Ver anexo 4).

5.7 Determinación de quercetina en muestras comerciales de caléndula

Se toman 20.0 mL de electrolito soporte, acetato de amonio 0.1 mol/L preparado en $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ 80:20, y se hace una adición de caléndula de 500 μL , así como adiciones sucesivas de quercetina 0.009 M se observa un polarograma muy parecido al de la quercetina sola, es decir la señal de oxidación muy cercana a 0.002 V y las señales de reducción en $E_1 = -0.6$ V, $E_2 = -1.15$ V y $E_3 = -1.6$ V esta última señal se encuentra ligeramente desplazada y puede deberse a la matriz de la muestra dicho desplazamiento, sin embargo es la que varía linealmente con la concentración y por ello es la que se utiliza para cuantificar. En la figura 24 a, b y c, se observan los polarogramas ampliando la señal cercana a -1.6 V que es la que se utiliza para cuantificar, en caléndula Hering y caléndula Oaxaca y en tintura de caléndula Eronga.

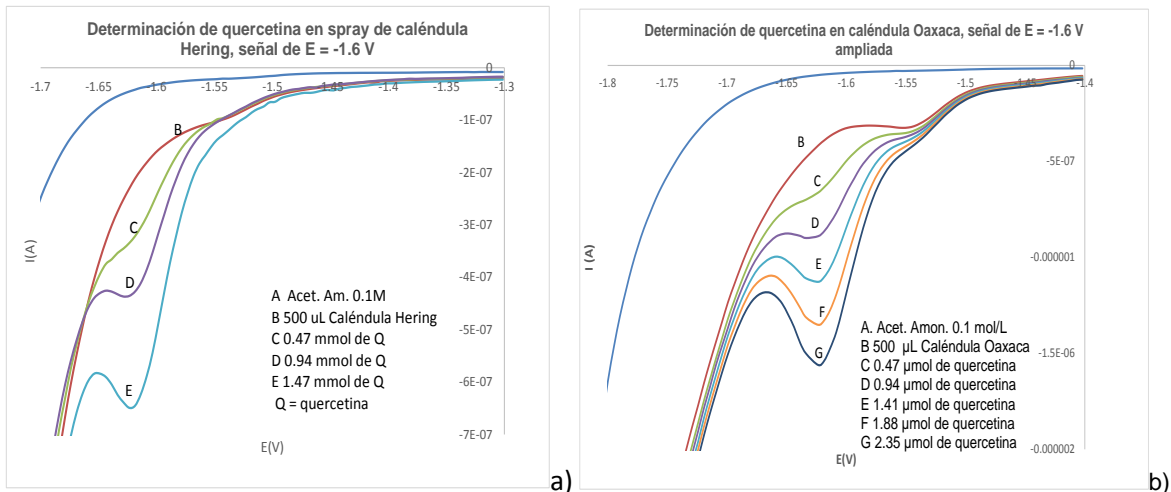


Figura 24 Polarogramas de: a) la determinación de quercetina en spray de caléndula Hering, b) Determinación de quercetina en tintura de caléndula Oaxaca,

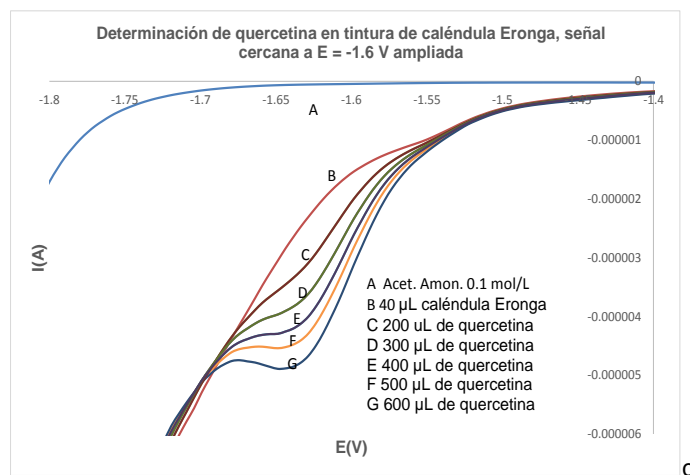


Figura 24 c) Polarograma de la determinación de quercetina en tintura de caléndula Eronga

Después de obtener la polarografía de impulsos se obtienen las siguientes curvas de calibración estándar para la determinación de quercetina por el método de adiciones patrón, utilizando una disolución estándar de quercetina de $0.009 \pm 2.64 \times 10^{-5}$ mol/L. Se añaden 400 μ L de caléndula y luego adiciones sucesivas del estándar, se obtiene así la curva de calibración y de ahí la concentración de quercetina en la muestra cuya concentración se desconoce. A continuación se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada caléndula.

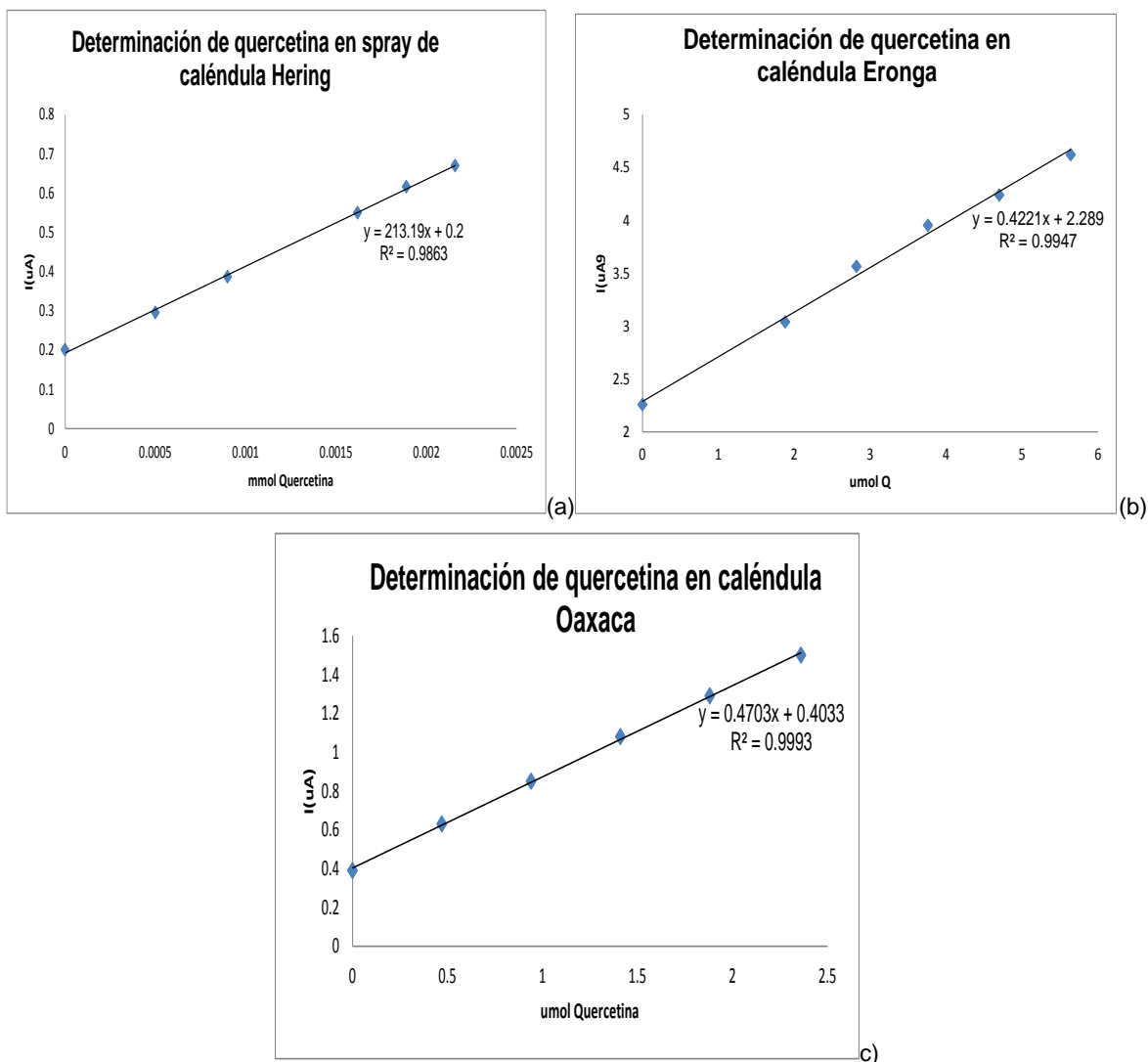


Figura 25. Determinación de quercetina en tinturas de caléndula comerciales. a) Spray de caléndula Hering, b) caléndula Eronga y c) caléndula Oaxaca.

Se hace éste procedimiento para a) caléndula Hering, b) caléndula Eronga 2003 y c) caléndula Oaxaca, se obtienen los siguientes resultados.

Tabla 8. Resultados de la determinación electroquímica de quercetina en tinturas de caléndula comerciales, por el método de adiciones estándar.

Muestra	Concentración de quercetina (mol/L)	Concentración de quercetina en ppm
Caléndula en spray Hering	1.87×10^{-3}	572.7
Tintura de caléndula Eronga	0.1356	41529
Tintura de caléndula Oaxaca	1.715×10^{-3}	525.23

Por este método cuando $y=0$, se obtiene la concentración de quercetina, si $y= 213.19x +0.2$, $x= 0.00938 \text{ mmol.}$, $0.00938\text{mmol}/0.5 \text{ mL} = 1.87 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

Como ejemplo de la determinación de la concentración de las muestras anteriores en ppm: $1.87 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ de quercetina $\times 306.26 \text{ g/mol}$ quercetina $\times 1000 \text{ mg/g} = 572.7 \text{ ppm}$ de quercetina en caléndula Hering. El método se logró aplicar adecuadamente y se obtienen los resultados esperados.

5.8 Polarografía clásica y diferencial de impulsos de crisina 0.001 mol/L y flavona 0.001 mol/L

Para realizar la polarografía clásica de crisina y flavona se utilizó como electrolito soporte acetato de amonio 0.1 mol/L en EtOH/H₂O 80:20, el dominio de electroactividad en este medio es de 0.2 V a -1.8 V vs Ag/AgCl/KCl 3M. Las condiciones son exactamente las mismas que para quercetina 0.009 mol/L (pág 8). Se trata del mismo electrolito soporte usado para la quercetina, por lo que se encuentra en la figura 12 a. Se obtiene lo siguiente para crisina y flavona:

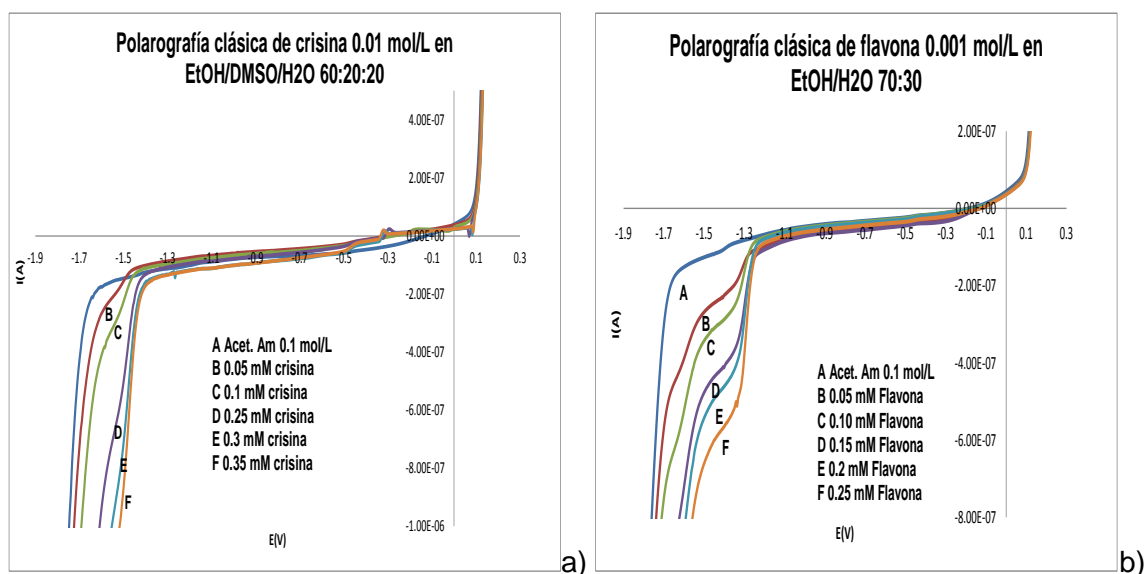


Figura 26 a). Polarografía clásica de crisina 0.01 mol/L y b) Polarografía clásica de flavona 0.01 mol/L

Polarografía diferencial de impulsos de crisina y flavona 0.01 M

Las condiciones de operación del equipo son las mismas que para la quercetina y se encuentran en la página 8.

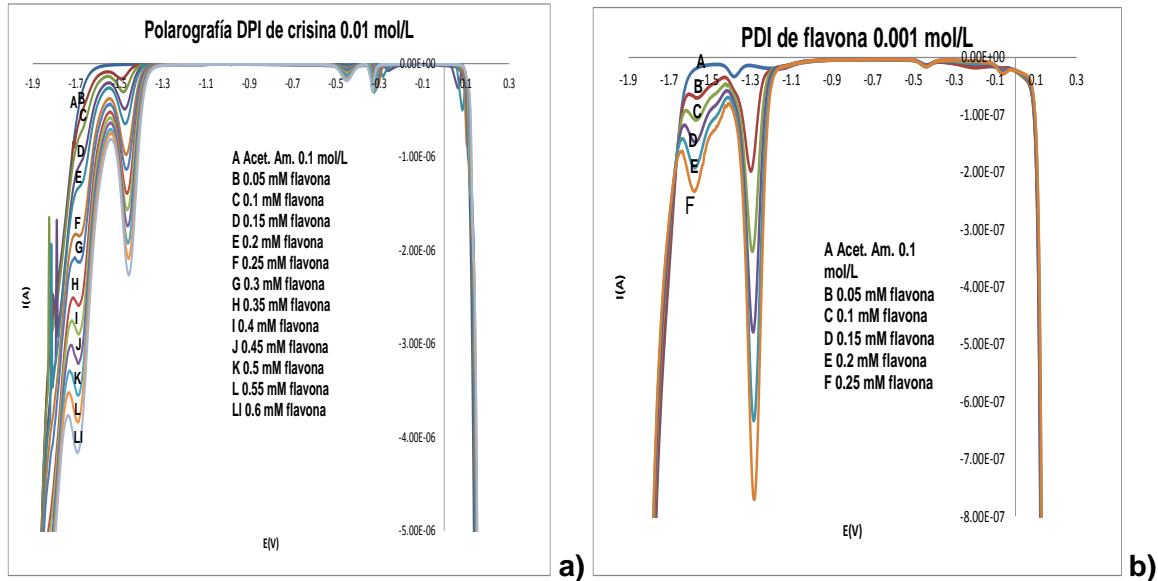


Fig. 27 a) Polarografía diferencial de impulsos (PDI) de crisina, b) PDI de flavona.

A continuación se resume lo obtenido para crisina 0.01 mol/L y flavona 0.01 mol/L

Tabla 9. Señales observadas por polarografía clásica y diferencial de impulsos de flavona 0.01 mol/L y crisina 0.01 mol/L

Antioxidantes	Señal 1 oxidación	Señal 1 de reducción	Señal 2 de reducción	Señal 3 de reducción	Señal 4 de reducción	Señal 5 de reducción
Crisina	-0.2 V	-0.3 V	-0.4 V	-1.5 V	-1.65 V	
Flavona	-0.05 V	-0.2 V	-0.5 V	-1.3 V	-1.45 V	-1.58 V

Este experimento se realiza para ayudarnos a discernir por el comportamiento polarográfico si las muestras comerciales contienen quercetina o por el contrario, crisina y flavona. Como se puede ver en los polarogramas, tanto crisina como flavona, presentan dos señales muy cercanas a la barrera catódica, las muestras comerciales en todo caso sólo presentan una y la atribuimos a quercetina.

6. CONCLUSIONES

Se logró cuantificar la quercetina mediante valoración potenciométrica por retroceso empleando HCl 0.01 mol/L. A pesar de que la quercetina posee 5 hidrógenos ácidos de naturaleza débil, sólo se detecta a dos de ellos, que son los “más ácidos” por efecto de resonancia, los otros se estabilizan por puentes de H.

Los experimentos realizados en este trabajo permitieron determinar las señales de oxidación-reducción para la quercetina usando un electrodo de gota de Mercurio (EGM).

Se observa lo siguiente: una señal de oxidación en 0.002 V, y tres señales de reducción, la primera en -0.6 V, la segunda en -1.15 V y la tercera en -1.63 V.

De éstas señales la de -1.63 V depende de la concentración, y presenta un límite de detección de 1.07×10^{-5} mol/L ó 3.23 ppm, por polarografía diferencial de impulsos.

El análisis logarítmico indica que la quercetina intercambia más de un electrón y del gráfico de Tafel para ésta señal $\alpha_n = 1.006$ e $i_0 = 7.9 \times 10^{-8}$ A, para una concentración de quercetina de 5.17×10^{-4} mol/L. Los parámetros encontrados por el gráfico de Tafel, y el valor de la k° del orden de $10^{-5.0}$, indican que se trata de un sistema moderadamente lento.

La quercetina es capaz de formar complejos con numerosos cationes metálicos, entre ellos Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Ba^{2+} en el presente trabajo se realiza la complejación cualitativa con diversos cationes y se realiza el estudio electroquímico de su complejación con sales de cobre (II). A través de las valoraciones complejométricas efectuadas se determinó la estequiometría de los complejos formados. Se encontró que la quercetina se puede complejar con cobre en estequiometrías 1:1, 1:2, y 2:1. Por lo tanto, obtenemos los complejos Cu(quercetina), complejo ML, Cu(quercetina)₂, complejo ML₂ y Cu₂(quercetina), complejo M₂L. Los valores de las constantes de formación globales son: para el complejo M₂L es $\log \beta = 10.03$. Para el complejo ML $\log \beta_1 = 4.94$ y para ML₂ $\log \beta_2 = 7.08$, los valores de las constantes de formación se determinan por el método de relación de intensidades obtenidas por polarografía diferencial de impulsos

Dado que se tiene un bajo límite de detección para la quercetina se logró cuantificar por este método la quercetina en muestras comerciales de Tintura de caléndula Eronga, caléndula en spray Hering y caléndula Oaxaca, usando el método de las adiciones estándar.

Se realiza la polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos para crisina y flavona ambas 0.001 mol/L se obtiene para crisina y flavona 4 y 5 señales de reducción respectivamente, para la crisina las señales de $E_{1/2}$ cuya i_p es directamente proporcional a la concentración son: $E = -1.49$ V, $E = -1.68$ V; la primera intercambia un e y la segunda

dos e. Para flavona las señales de $E_{1/2}$ que responde directamente a la concentración son $E = -1.27$ V intercambiando más de un e y la de $E = -1.5$ V intercambiando menos de un e.

El valor del potencial para crisina y flavona nos ayuda a distinguirlos de la quercetina en caso de querer identificarlos y para análisis cuantitativo.

La técnica electroquímica analítica es una técnica barata relativamente, respecto a otras técnicas como HPLC, CG y permite la cuantificación de antioxidantes naturales como los flavonoides, en muestras comerciales con utilidad alimentaria o farmacéutica con un buen límite de detección.

De los tres flavonoides estudiados el que presenta mayores beneficios a la salud es la quercetina, presenta un potencial de reducción muy negativo -1.63 V por lo que es un muy buen reductor, en el caso de la flavona el potencial más bajo obtenido es -1.58 V y en el caso de crisina el potencial más bajo que presenta es de -1.65 V; por lo que se puede concluir que flavona y quercetina se pueden distinguir entre ellas por los potenciales de reducción, y la crisina y quercetina por el número de señales que presentan.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Amoros M., Simoes C., Girre L., Sauvager F., Cornier M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus tipe 1 en cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat Prod.* 1992, 55, 1732-1740.
2. Bard A., Faulkner L. (1980) *Electrochemical Methods*. John Wiley and sons, Canadá, 1980. pp. 106-107.
3. Crozier A., Lean M.E.J., McDonald M.S., Black C. (1997). Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *J. Agric. Food Chem.* 45 590 (1997).
4. Fessenden R., y Fessenden J.(1983) *Química Orgánica*. Interamericana, México 1983. pp 243-244.
5. González C. (2017) análisis aplicado a la ingeniería química. Métodos voltamperométricos y polarografía.: http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieriaquimica/contenidos/course_files/Tema_9.pdf.
6. Haleagrajara N., Miranda S., Abdul M., Hayes L., Bird G., Ketheesan N., (2017) Therapeutic effect of Quercetin in collagen induced arthritis. *Biomed. and Pharm.* 2017, 90, 38-46
7. Hanasaki Y., Ogawa S., Fukul S. (1994) The correlation between active oxigen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 1994, 16, 845-850
8. Harborne J. B. (1994) Ed. *The Flavonoids, Advances in Research Since 1986*; Chapman and Hall: London, 1994.
9. Harris D.(2001) *Análisis Químico Cuantitativo*. 2ª ed. Edit Reverté, España 2001, pp 474-475.
10. Hertog M., Hollman P. (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J. Clin. Nutr.*, 1996, 50, 63-71
11. Hoyle W. y Thorpe T. (1978) Pulse Polarography: A series of students Experiments. *Journal of Chemical Education*, 1978,55, A229

12. Jovanovic S., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B. y Simic M. (1994) Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 4846-4851.
13. Kathyal M. (1968) Flavones as analytical reagents-a review. *Talanta*, 1968, 15, 95-105.
14. Kuhmau, J., (1976). The flavonoids. A class of semiessential food components: Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 1976, 24, 117-191.
15. Leopoldini M, Russo N., Chiodo S., Toscano M, (2006) Iron Chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 6343-6351.
16. López T.L., (2016) "Estudio de complejos metálicos con ligandos de interés biológico". Tesis doctoral. Universidad nacional de la plata. Argentina, 2016.
17. Manthey J., Guthrie N. 2002. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5837-5843.
18. Martínez L., (2016) "Determinación de Métodos analíticos de la calidad de la miel en abejas nativas sin aguijón (Apidae: Meliponini) en la cuenca del Balsas, Michoacán México". Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México 2016.
19. Martínez S., González J. Culebras J. y Tuñón Ma. J., (2002). *Nutr. Hosp.* 2002, 17(6), 271-278.
20. McMurry J. (2011) *Química orgánica*. Gengaje. México D.F., 2011. p1224
21. Muñoz F., (1987) "*Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*". Madrid, Edit. Mundo Prensa.1987:365
22. Pingarrón J.M., Sánchez P. (2003) *Química electroanalítica. Fundamentos y Aplicaciones*. Madrid España 2003, p 382
23. Ruíz P. y Ramírez S. (2012) Estudio del comportamiento de Quercetina en presencia del cobre, utilizando UV-Vis, Voltamperometría cíclica y voltamperometría diferencial de impulsos.<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=16073&docs=UAMI16073.PDF>
24. The Merck Index, (1989) Ed. Merck & Co. Inc. 11ª edición Estados Unidos, 1989, pp. 1278
25. Vassos B. y Ewing G., (1998) *Electroquímica Analítica*, Limusa, México 1998, pp 84-85
26. Viswanathan P., Sriram V., Yugeeswaran G. (2000) Sensitive spectrophotometric assay for 3-hydroxy substituted flavonoids, base on their binding with Molybdenum, Antimony, or Bismuth. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2802-2806

ANEXOS

Anexo 1. Estudio logarítmico de las curvas I vs E para la obtención de $E_{1/2}$

Al utilizar la ecuación de Nernst tenemos:

$$E' = E^{\circ} + \frac{0.0596}{n} \log [Oxd]_{elec} / [Red]_{elec} \quad (1)$$

Al tener un sistema reversible las concentraciones de oxidante y de reductor al electrodo son proporcionales a:

$$[Ox]_{electrodo} = (i - i_{ox}) / K_{ox} \quad (2)$$

$$[Red]_{electrodo} = (i_{red} - i) / K_{red} \quad (3)$$

Sustituyendo en la ecuación de Nernst:

$$E' = E^{\circ} + \frac{0.0596}{n} \log \frac{\frac{i-i_{ox}}{K_{ox}}}{\frac{i_{red}-i}{K_{red}}} \quad (4)$$

$$E' = E^{\circ} + \frac{0.0596}{n} \log \frac{K_{red}}{K_{ox}} + \frac{0.0596}{n} \log \frac{i-i_{ox}}{i_{red}-i} \quad (5)$$

Como rara vez se conoce el E' se puede poner

$$E = E^{\circ} + \frac{0.0596}{n} \log \left(\frac{K_{red}}{K_{ox}} \right) + \frac{0.0596}{n} \log \frac{(i-i_{ox})}{(i_{red}-i)} \quad (6)$$

Dado que:

$$E_{\frac{1}{2}} = E^{\circ} + \frac{0.0596}{n} \log \left(\frac{K_{red}}{K_{ox}} \right), \quad (7)$$

entonces

$$E = E_{\frac{1}{2}} + \frac{0.0596}{n} \log (i - i_{ox}) / (i_{red} - i) \quad (8)$$

De tal forma que si se tiene solo al oxidante tendríamos

$$E = E_{\frac{1}{2}} + \frac{0.0596}{n} \log \left(i - \frac{i_{ox}}{-i} \right) \quad (9)$$

Y si se tiene solo al reductor:

$$E = E_{1/2} + \frac{0.0596}{n} \log \left(\frac{i}{i_{red}} - i \right) \quad (10)$$

Si se encuentra solo un oxidante, la ecuación (9) es la que se utiliza, obteniendo así una línea recta, del tipo $mx+b$.

Al graficar el potencial (E) vs. el log de $[(i-i_d)/-i]$ la pendiente es igual a $0.0596/n$, de donde se puede conocer el número de electrones intercambiados, si la pendiente es menor a 0.0596 entonces se intercambian más de un electrón; por su parte la ordenada al origen se obtiene del segundo término de la ecuación y nos indica el $E_{1/2}$. El $E_{1/2}$ es característico para cada par redox y es independiente de la concentración.

Para llevar a cabo éstos estudios se utilizaron los datos de las curvas i vs E obtenidas experimentalmente por polarografía clásica, para una concentración de quercetina de 5.64×10^{-4} M en etanol-agua 80:20 y utilizando acetato de amonio 0.1 M como electrolito soporte. A continuación se muestra el ejemplo.

Tabla 9. Valores experimentales para análisis logarítmico

I corregida (nA)*	log (i-i_d)/-i 	E(V)
28.6	1.04660703	-1.5833
34.3	0.95983376	-1.5883
42.2	0.85870251	-1.5933
53.1	0.74310506	-1.5984
66.9	0.62188699	-1.6034
82.8	0.50390248	-1.6084
103	0.3745526	-1.6135
150	0.24944296	-1.6185
173	0.11837497	-1.6235
199	0.00250315	-1.6286
221	-0.12859136	-1.6336
242	-0.24402173	-1.6386
259	-0.36262607	-1.6437
274	-0.46881709	-1.6487
287	-0.5744277	-1.6537
297	-0.67973065	-1.6588
304	-0.84940513	-1.6689
313	-0.96406542	-1.6739
317	-1.02393801	-1.6789
321	-1.09153168	-1.684
324	-1.14881717	-1.689
327	-1.21351776	-1.694
329	-1.26192339	-1.6991
330	-1.28806502	-1.7041
331	-1.31570801	-1.7091
334	-1.40980311	-1.7142
334	-1.40980311	-1.7192

*Es el valor absoluto de la corriente menos la corriente residual, para diferentes valores de potencial cercanos a -1.63 V.

Graficando los valores obtenemos la figura número 15 a.

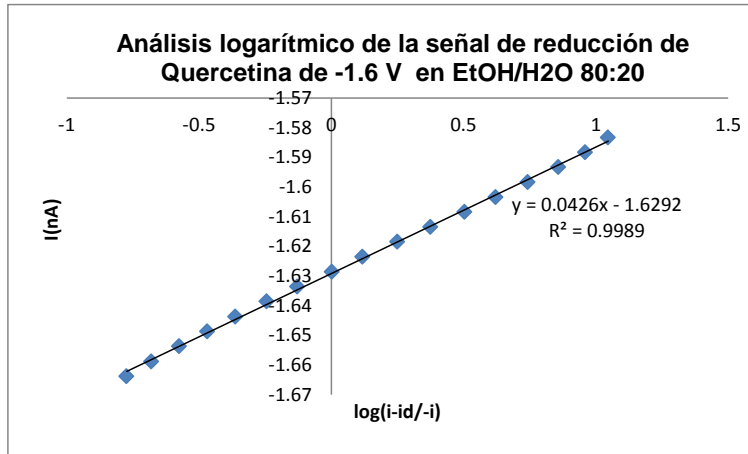


Figura 15a. Estudio logarítmico de la señal de reducción de quercetina de -1.63 V

En el gráfico vemos una ordenada al origen de -1.63 V que corresponde al $E_{1/2}$ para ésta señal, la pendiente m es 0.0426, como la pendiente es menor a 0.0596, podemos asegurar que se intercambia más de un electrón, la señal muestra un comportamiento no nerstiano.

Realizando éste tipo de análisis se obtienen valores de $E_{1/2}$ para las señales de reducción de quercetina más cercanas a la barrera en -1.63 V y la segunda en -1.15 V.

Anexo 2. Gráficos de Tafel

El modelo de Tafel nos permite evaluar la reversibilidad. Cuando en una reacción electroquímica se involucra un electrón y se lleva a cabo en un solo paso, el factor de simetría coincide con el coeficiente de transferencia de carga (α) y suele tener un valor cercano a 0.5. (Pingarrón y Sánchez, 2003)

La i_0 es la corriente de intercambio que se obtiene para el potencial de equilibrio. Representando la función $\eta = f(\log i)$, se obtiene una recta en la que se observa que la extrapolación para $\eta=0$, da como abcisa el valor de i_0 .

El gráfico de Tafel es la representación de \log de i en función de η .

$$\log i = \log i_0 - \frac{\alpha n F}{2.3 RT} \eta$$

Donde η es el sobrepotencial, i_0 la constante de equilibrio, que representa la corriente que se transfiere al potencial de equilibrio (E_{eq}). Normalmente se desconoce el η por lo que suele utilizarse el potencial medido en las curvas i vs E y representarlo frente al \log de i .

En este caso se utilizan las curvas obtenidas i vs E para la concentración de quercetina de 2.596×10^{-4} M, se utilizan valores de potencial cercanos a -1.63 V.

Tabla 10. Datos de E y $\log i$

$E(V)$	$i(A)$	$\log i$
--------	--------	----------

-1.553	0.00000009	-7.04575749
-1.5581	1.0742E-07	-6.96891485
-1.5631	1.3104E-07	-6.88259612
-1.5681	1.5945E-07	-6.79737548
-1.5732	1.9675E-07	-6.70608526
-1.5782	2.418E-07	-6.6165437
-1.5833	2.9849E-07	-6.52507021
-1.5883	3.6283E-07	-6.44029681
-1.5933	4.3971E-07	-6.35683366
-1.5984	5.2698E-07	-6.27820587
-1.6034	6.2619E-07	-6.20329387
-1.6084	7.3007E-07	-6.1366355
-1.6135	8.4463E-07	-6.0733335
-1.6185	9.6413E-07	-6.0158644
-1.6235	1.0903E-06	-5.96246594
-1.6286	1.215E-06	-5.91543445
-1.6336	1.337E-06	-5.87385885
-1.6386	1.4602E-06	-5.83559658
-1.6437	1.5769E-06	-5.80220962
-1.6487	1.6891E-06	-5.77234978
-1.6537	1.7838E-06	-5.74865141
-1.6588	1.875E-06	-5.72700799
-1.6638	1.9609E-06	-5.70754677
-1.6689	2.0266E-06	-5.69324053
-1.6739	2.0871E-06	-5.68045258
-1.6789	2.1376E-06	-5.67006746
-1.684	2.186E-06	-5.66034388
-1.689	2.2235E-06	-5.65295896
-1.694	2.2533E-06	-5.64718869
-1.6991	2.2841E-06	-5.64128679
-1.7041	2.3021E-06	-5.63786827

Con los datos de la tabla anterior se grafica E vs log i, y se obtuvo la gráfica de la figura 15b.

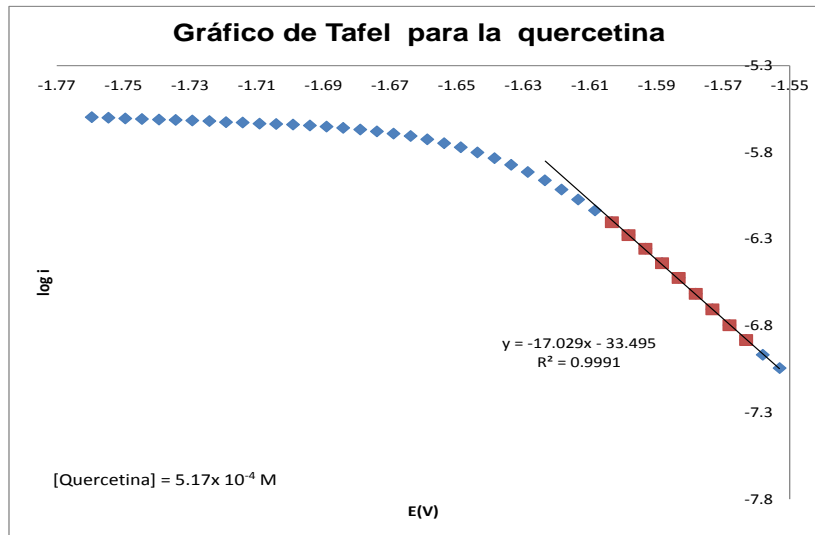


Figura 15b Gráfico de Tafel para quercetina en EtOH/H₂O 80:20

El trazo del gráfico de Tafel es una herramienta que se utiliza para evaluar parámetros cinéticos. Donde $m = -\alpha nF/2.3RT$ (Bard A., Faulkner L. (1980), α es el coeficiente de transferencia de carga.

Despejando de la ecuación anterior tenemos, $\alpha n = -\frac{(m \cdot 2.3 \cdot RT)}{F}$

$$\alpha n = -\frac{(-17.029 \cdot 2.3 \cdot 8.31447 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \cdot 1 \text{C} \cdot 298.15 \text{K})}{96485.33 \text{C/mol}} = 1.006$$

En el caso de la quercetina se obtiene un valor de $\alpha n = 1.006$ y como el número de electrones intercambiados n es mayor a 1, si fueran 2 tendríamos un α de 0.503.

En la gráfica se observa que en -1.55 V el valor de $\log i$ tiende a menos infinito, es decir que -1.55 V es el potencial de equilibrio y por lo tanto el valor de $\log i$ dado por la ecuación anterior a dicho potencial puede considerarse como la corriente de intercambio o $\log i_0$ (Briones, 2014).

De la ec de la recta $y = -17.029x - 33.495$

$$\log i_0 = -17.029(-1.55) - 33.495 = -7.1, \text{ por lo tanto } i_0 = 7.9 \times 10^{-8} \text{ A.}$$

Anexo 3. Linealidad y límite de detección

Para los cálculos de linealidad y límite de detección se usan los resultados obtenidos en la curva de calibración para la señal de reducción de -1.629 V gobernada por difusión, misma que se obtuvo por PDI. En el siguiente ejemplo, donde el electrolito soporte es Acetato de amonio 0.1 M en etanol-H₂O 80:20 y se hicieron adiciones sucesivas de Quercetina de concentraciones comprendidas entre: $4.5 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 5.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (0.045 mM-0.54 mM), se realizaron los parámetros mencionados.

Tabla 11. Concentración de quercetina y la intensidad de corriente de pico para la señal de reducción de quercetina de -1.63 V

[Quercetina] mM	I(μA)
0.045	0.184
0.09	0.326
0.135	0.483
0.18	0.627
0.225	0.788
0.27	0.927
0.315	1.09
0.36	1.22
0.405	1.35
0.45	1.51
0.495	1.65
0.54	1.78

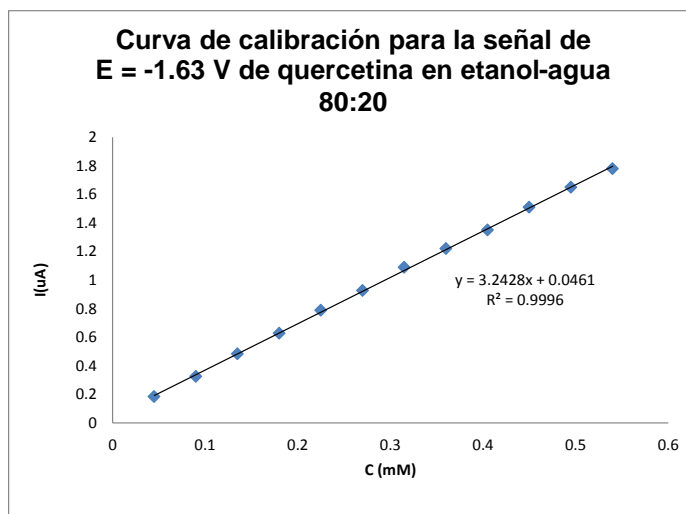


Figura 17b. Curva de calibración para la señal de -1.63 V de quercetina en etanol-H₂O 80:20

A partir de la curva de calibración obtenemos la ecuación de la recta que corresponde a la regresión lineal de los puntos graficados. La linealidad del método está dada por el coeficiente de correlación. En éste caso, $y = 3.2428X + 0.0461$, $R^2 = 0.9996$. Con lo que podemos decir que la curva presenta una linealidad muy cercana a la unidad, por lo tanto, la intensidad de corriente es directamente proporcional a la concentración, o bien que la señal de reducción de -1.63 V está regulada por difusión, lo que permite su aplicación con fines cuantitativos.

Para calcular la mínima concentración de quercetina que puede detectarse, ó límite de detección (LDD) se utilizaron las sigs. ecuaciones:

$$S_{i/c} = \left\{ \frac{\sum (i_{exp} - i_{calc})^2}{(n-2)} \right\}^{1/2}$$

$$i_{calc} = C_{exp} \times m + b$$

Donde: $S_{i/c}$ = desviación estándar de la recta
 C_{exp} : Conc de quercetina en la celda.

$$LDD = 3 S_{i/c}/m$$

i_{exp} : intensidad de corriente experimental

LDD: límite de detección m : pendiente de la ec de linealidad b : ordenada de la ecuación de linealidad

El límite de detección encontrado para la quercetina es de 3.23 ppm ó 1.07×10^{-5} M. Lo anterior se ilustra en la tabla siguiente.

Tabla 12. Cálculos de límite de detección

C	I(uA)	ical(uA)	[iexp-ical] ²	$\Sigma(iexp-ical)^2$	sic/m	LDD (mM)	LDD(M)	ppm
0.045	0.184	0.192026	6.4417E-05	6.44167E-05	0.001348161	0.01074072	1.07 x10-5	3.23
0.09	0.326	0.337952	0.00014285	0.00014285	0.01161			
0.135	0.483	0.483878	7.7088E-07	7.70884E-07				
0.18	0.627	0.629804	7.8624E-06	7.86242E-06				
0.225	0.788	0.77573	0.00015055	0.000150553				
0.27	0.927	0.921656	2.8558E-05	2.85583E-05				
0.315	1.09	1.067582	0.00050257	0.000502567				
0.36	1.22	1.213508	4.2146E-05	4.21461E-05				
0.405	1.35	1.359434	8.9E-05	8.90004E-05				
0.45	1.51	1.50536	2.153E-05	2.15296E-05				
0.495	1.65	1.651286	1.6538E-06	1.6538E-06				
0.54	1.78	1.797212	0.00029625	0.000296253				
					0.001348161			

$n=12$, $m = 3.2428$ y $b= 0.0461$

Anexo 4. Determinación de las constantes de formación de los complejos, método relación de intensidades

De la gráfica donde se encuentra la estequiometría de los complejos se toman los datos. Ejemplo de la determinación de la constante global de formación para el complejo M_2L .

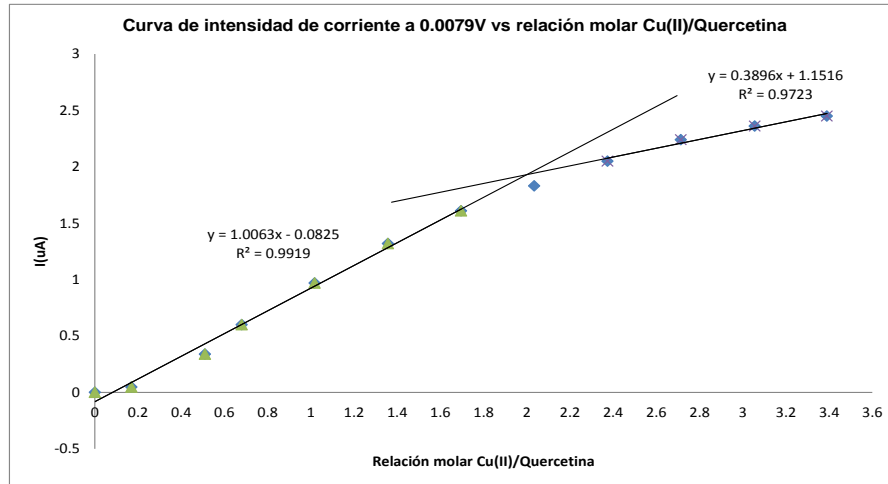


Fig. 20b i_p para la señal de 0.0079 V vs relación molar (Cu(II)/Quercetina)

El cruce de las líneas se obtiene igualando las ecuaciones de las rectas, $1.0063x - 0.0825 = 0.3896x + 1.1516$, despejando x , tenemos $x = 1.93$. Debajo de las rectas se puede ver que el gráfico tiene una ligera curvatura y se sabe que esa curvatura nos puede dar el coeficiente de disociación del complejo.

M_2L tiene una $i = nKdC = 1.93$ (medido en la parte lineal)

$i = nKdC(1-\alpha) = 1.83$ (parte curvada de la gráfica). Si se hace una relación de ambos valores tenemos:

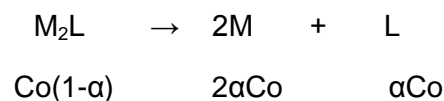
$$\frac{1.93}{1.83} = \frac{nKdC}{nKdC(1-\alpha)}$$

Eliminando términos comunes queda:

$$1.054 = 1/(1-\alpha)$$

$$1-\alpha = 0.9488 \quad \text{y} \quad \alpha = 0.05123$$

Tenemos el equilibrio:



$$Kd = \frac{[2\alpha Co^*]^2 [Co^*]}{Co^*(1-\alpha)} = \frac{4\alpha^3 Co^{*2}}{(1-\alpha)}$$

$$Co^* = \frac{0.009 \text{ M} * 0.5 \text{ mL}}{11.1 \text{ mL}} = 0.0004054 \text{ M}$$

Sustituyendo en la Kd los valores de α y de la concentración se tiene:

$$Kd = \frac{4(0.05123)^3(4.054 \times 10^{-4})^2}{(1-0.05123)} = 9.32 \times 10^{-11} = 10^{-10.03}$$

$$Kf = i/Kd = 10^{10.03}$$

De ésta manera se determinaron las constantes globales de formación de los diferentes complejos formados.

Anexo 5. Estudio logarítmico de las gráficas de Tafel para obtener la constante heterogénea de transferencia de carga k° .

Se obtiene el gráfico de Tafel para diferentes concentraciones de quercetina a partir de la polarografía clásica, se trabaja con la señal de $E = -1.63$ V. En la tabla 10 se observa los valores de $\log i_0$, αn , pendiente y ordenada al origen calculados para diferentes concentraciones de quercetina.

Tabla 10. Resultados de los gráficos de Tafel para la reducción de quercetina 0.009 mol/L en etanol-agua 80:20

C^* (mol/cm ³)	m	Ordenada	αn	$\log i_0$
3.15×10^{-7}	-17.909	-35.194	1.058	-7.38
3.6×10^{-7}	-17.549	-34.544	1.037	-7.29
4.5×10^{-7}	-16.552	-32.806	0.9780	-7.15
4.95×10^{-7}	-17.029	-33.495	1.006	-7.1
5.4×10^{-7}	-16.439	-32.497	0.9713	-7.01

Por otra parte la corriente de intercambio i_0 del sistema electroquímico depende de la concentración de las especies electroactivas en el seno de la disolución (C^*) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$i_0 = nFAk^\circ(C^*_{RED})^{(1-\alpha)}(C^*_{OX})^\alpha$$

$$i_0 = nFAk^\circ(C^*_{OX})^{(1-\beta)}(C^*_{RED})^\beta$$

Si $C^*_{RED} = 0$, entonces:

$$\log i_0 = \log nFAk^\circ + \alpha \log C^*_{OX}$$

$$\log i_0 = \log nFAk^\circ + (1-\beta) \log C^*_{OX}$$

Por lo que la gráfica de $\log i_0$ en función de $\log C^*$ da como resultado una recta de pendiente igual a $(1-\beta)$, y de ordenada al origen igual a $\log(nFAk^\circ)$. Siendo: $\alpha + \beta = 1$

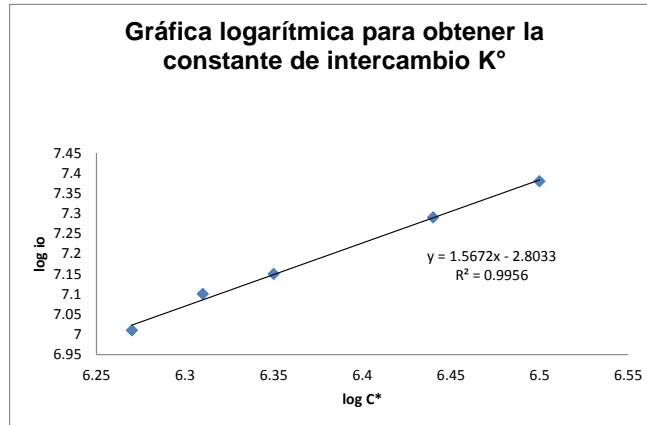


Figura 29. Gráfica del estudio logarítmico para obtener k° .

La figura 29 muestra un valor de pendiente de 1.5672, para la reducción de quercetina; con el dato de la ordenada al origen se obtiene la constante de transferencia de carga del orden de $10^{-5.87}$ cm/seg. Estos valores indican que se trata de un sistema electroquímico moderadamente lento de acuerdo a los criterios presentados por Bard, 1980.

Calculo de k°

$$\log nFAk^\circ = -2.8083$$

$$nFAk^\circ = 10^{-2.8083} = 10^{-2.8083}$$

$$\text{Si } n = 2.0, F = 96\,485.33 \text{ C/mol}$$

$$A = 6 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$k^\circ = 10^{-2.8083} / nFA, \quad k^\circ = (10^{-2.8083}) / (2)(96485.33)(6 \times 10^{-3}) = 10^{-5.87} \text{ cm/seg}$$



Los girasoles . Vang Gogh



Flores de Caléndula.