



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

División de Estudios de Posgrado

**FACTORES EN LA DETERMINACION
DEL pH EN SOLUCIONES DE
INTERES BIOQUIMICO.**

T E S I S

Que para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(FISICOQUIMICA)

P r e s e n t a :
JULIO COLLADO VIDES

México, D. F.

Diciembre, 1986



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.

Los sinodales del examen son:

Presidente	Dr. Armando Gómez-Poyou.
ler. Vocal	Dr. Francisco Lara Ochoa.
Secretario	Dr. Yunny Meas Vong.
Suplente	Dr. Auster Valderrama Cano.
Suplente	M.en C. Rebeca Sandoval.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez-Armáss Acuña (asesor externo); fungió como asesor interno el Dr. Auster Valderrama Cano.

El trabajo de tesis se realizó de 1983 a 1986 en el laboratorio del Dr. Sánchez-Armáss de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, I.M.S.S.; en los laboratorios de la Dra. Rocío Salceda y del Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.; en el laboratorio del Dr. Yunny Meas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y en el laboratorio de electroquímica (química analítica) con el M. en C. Alejandro Baeza de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U.N.A.M.

El hombre es el estilo.

Buffon.

A mi esposa, María.

i

A mi generación, compañeros
de lucha y esperanza.

I N D I C E.

	pág.
PARTE A. FUNDAMENTOS FISICOQUIMICOS.	
I. INTRODUCCION.....	5
I.1. Noción y definición operacional del pH.....	5
I.2. Plan de la Tesis.....	5
I.3. Antecedentes del eflujo ácido de sinaptosomas	5
II. POTENCIAL DE UNION LIQUIDA.....	7
II.1. Introducción.....	7
II.2. Expresión general del potencial de unión líquida.....	9
II.3. Unión líquida homoiónica.....	13
II.4. Uniones líquidas heteroiónicas.....	15
III. ORIGEN DEL POTENCIAL DEL ELECTRODO DE VIDRIO.....	19
IV. DEFINICION OPERACIONAL DEL pH.....	24
IV.1. Noción de pH.....	24
IV.2. Definición operacional del pH.....	24
IV.3. Soluciones estándar de referencia.....	25
IV.4. Pendiente o eficiencia electromotriz.....	27
IV.5. pH de una solución amortiguada en función de la fuerza iónica.....	29
PARTE B. RESULTADOS.	
V. METODOLOGIA.....	31
VI. PARAMETROS DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS ELECTRODOS...	35
VI.1. Parámetros del electrodo de vidrio.....	35
VI.2. Parámetros del electrodo de referencia.....	37
VI.3. Parámetros de la unión líquida.	38
VI.4. Parámetros del sistema de registro completo.	39
VII. ESTABILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LA LECTURA DE pH	41
VII.1. Estabilidad.....	41
VII.2. Reproducibilidad.....	43
VIII. EXACTITUD.....	48
VIII.1. Determinación de la concentración del ácido	48
VIII.2. Predicciones y datos experimentales.....	49
VIII.3. Diferencias por agitación.....	50

IX.	pH EN FUNCION DE LA FUERZA IONICA.....	52
	IX.1. Soluciones de HEPES y de Tris.....	52
	IX.2. Determinación experimental del potencial de unión líquida.....	55
X.	EFECTO DE SUSPENSION.....	59
XI.	APLICACION: ELIMINACION ACIDA DE SINAPTOSOMAS....	61
	XI.1. Curva estándar.....	61
	XI.2. Controles.....	61
	XI.3. Eliminación ácida.....	63
XII.	CONCLUSIONES Y DISCUSION.....	65
XIII.	BIBLIOGRAFIA.....	68

RESUMEN.

La tesis está dividida en dos partes. En la primera parte se describen los fundamentos fisicoquímicos con énfasis en el potencial de unión líquida, necesarios para comprender la determinación del pH con electrodo de vidrio. En la segunda parte se describe la evaluación de los distintos errores provenientes de la determinación del pH con electrodo de vidrio, originados por el comportamiento de la unión líquida en soluciones amortiguadas con HEPES 1.6 Mm, en el intervalo de 1.6 a 160 mM de fuerza iónica. A continuación se hace un resumen de los resultados obtenidos.

Se determinaron características del funcionamiento adecuado de los electrodos utilizados: la pendiente $>95\%$, la respuesta a los 10 seg. de pasar el electrodo de vidrio del estándar pH 10 al de 4 $>98\%$, la diferencia de potencial entre 2 electrodos de calomel de $\pm 1\text{mV}$, en curvas $i-v$ se determinó la no polarizabilidad de los electrodos; la resistencia de la unión líquida tanto con un multímetro como a partir de un registro de impedancia a alta frecuencia, y el tiempo de respuesta de 0.16 seg. a la adición ácida.

Se obtuvo por otro lado una estabilidad de ± 0.02 pH/30 min. La reproducibilidad de la lectura tanto en un mismo día como en días sucesivos fue de ± 0.01 pH.

Se determinó por titulaciones potenciométrica y volumétrica, así como por la lectura del pH, la concentración de una solución HCl 4.3 mM. En adiciones sucesivas del HCl 4.3 mM a un Ringer HEPES 1.6 mM, se obtuvieron resultados coincidentes con la evaluación teórica, con una pendiente de $0.19\text{pH}/\mu\text{mol}$ de H^+ . Esta curva se utilizó posteriormente como estándar para la evaluación de la eliminación ácida de los sinaptosomas.

En soluciones con HEPES o Tris 1.6 mM, se observó un incremento del pH en función de la fuerza iónica, que difiere de las predicciones teóricas de los coeficientes de actividad del amortiguador así como del potencial de unión líquida según Henderson.

Se determinó el potencial de unión líquida en soluciones de HEPES 1.6 mM utilizando dos electrodos de calomel y se obtuvo un potencial mayor que el predicho por la ecuación de Henderson, que concuerda con las lecturas previas del pH en función de la fuerza iónica. El resultado obtenido puede explicarse cualitativamente suponiendo una unión del K^+ al vidrio poroso.

Se determinó de forma preliminar, la alteración del pH por la presencia de partículas cargadas en función de la fuerza iónica, utilizando una suspensión de resina de intercambio catiónica.

La tesis termina con una aplicación biológica utilizando la evaluación del pH con el objeto de cuantificar el eflujo ácido de sinaptosomas obtenidos del sistema nervioso central de la rata. Se discuten los errores previamente evaluados y se muestra que no interfieren en la determinación del eflujo. Se determinó un eflujo rápido equivalente a 14 nmoles/min/mg de proteína, independiente de la concentración externa de sodio, el cual se inhibe completamente a 0°C .

SUMMARY.

The thesis is divided in two parts. In the first one the physicochemical principles of pH determination with emphasis on liquid junction potential, are described. In the second part we present the determination of the different errors in the pH measurements with the glass electrode, caused by the behavior of the liquid junction in 1.6 mM HEPES buffered solutions, within the range of 1.6 to 160 mM ionic strength. We present a summary of the results.

Characteristics of the following electrode behavior were determined: The slope $>95\%$; the response at 10 sec. after changing the glass electrode from pH 10 to pH 4 $>98\%$; the potential difference between two calomel electrodes $\pm 1\text{mV}$; the non polarizability of the calomel electrodes determined by i-v plot; the resistance through the liquid junction measured both with a multimeter and with a high frequency impedance plot and finally the response time of 0.16 sec. to acid addition.

A stability of ± 0.02 pH/30 min. was obtained. The reproducibility of the pH measurement in the same day as well as in different days was ± 0.01 pH. The concentration of an HCl solution was determined by potentiometric and volumetric titrations and by pH reading. With successive additions of this 4.3 mM HCl to a Ringer HEPES 1.6 mM solution, we obtained coincident results with the theoretical prediction of a 0.19 pH/ μmol of H^+ slope. This plot was later used as a standard for acid efflux evaluation from synaptosomes.

It was observed an increase in pH as function of ionic strength in HEPES or Tris 1.6 mM solutions, which differed from the theoretical predictions of the buffer's activity coefficients and the Henderson's liquid junction potential.

The liquid junction potential in HEPES 1.6 mM solutions was measured utilizing two calomel electrodes, obtaining a bigger potential than the Henderson's equation prediction, but coincident with the previous pH measurements as function of ionic strength. This result may be qualitatively explained supposing that K^+ binds to the porous glass of the junction.

In a preliminary way, the pH change due to the presence of resuspended charged particles was measured as a function of ionic strength within a cation exchange suspension.

The thesis finishes with a biological application of pH measurements for the quantification of the acid efflux from synaptosomes obtained from the central nervous system of the rat. The previously obtained results are discussed and it is shown that they do not disturb this efflux evaluation. A fast efflux equivalent to 14 nmol/min./mg. protein was determined, which was found to be independent of external sodium concentration and completely inhibited at 0°C .

I. INTRODUCCION.

I.1. Noción y Definición operacional del pH

En 1924 Sorensen definió el $\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$ en términos de la actividad de los protones; sin embargo experimentalmente no es posible determinar la actividad en solución de un solo ión, por lo que se requiere una definición operacional en términos del método de medida.

Es decir que, si bien la determinación del pH de cualquier solución, en el laboratorio es una rutina fácil, el valor obtenido no es de interpretación directa. Inclusive la escala internacional actualmente aceptada (Covington et al. 1985) da indicaciones de la relación entre el pH leído y la concentración o actividad de protones en el medio, únicamente para soluciones electrolíticas 1:1 en concentración no mayor a 0.1M.

La determinación en términos de la actividad de protones, es de interés solamente en ciertos estudios de investigación. En la industria, como en rutinas de control, es importante la determinación del pH en una escala arbitraria bajo condiciones constantes, independientemente del valor de actividad de protones.

I.2. Plan de la Tesis.

La tesis se divide en dos partes. La primera parte se ocupa de los fundamentos necesarios para el conocimiento adecuado del pH. Se desarrollan inicialmente los conceptos y notaciones de las celdas electroquímicas, para definir la celda potenciométrica del electrodo de vidrio como una celda con unión líquida. Enseguida se obtiene la ecuación de Henderson, para la determinación del potencial de unión líquida residual. Se ilustra el modelo de Eisenman que explica el origen del potencial del electrodo de vidrio y finalmente se desarrolla la definición operacional del pH según la escala internacional.

La segunda parte empieza con un capítulo de metodología; enseguida se describen los resultados experimentales, del funcionamiento de los electrodos, las determinaciones de estabilidad, reproducibilidad y exactitud de la lectura del pH.

Enseguida se muestra la determinación experimental del potencial de unión líquida y la comparación con las lecturas del pH en soluciones de diferente fuerza iónica en el intervalo no mayor a 160 mM. Los resultados se comparan con el tratamiento teórico de Henderson. En el siguiente capítulo se ilustra el llamado efecto de suspensión y los resultados experimentales terminan con un capítulo de aplicación biológica: la determinación de la eliminación ácida de sinaptosomas del sistema nervioso central de la rata.

Los antecedentes correspondientes al eflujo determinado en los sinaptosomas, se desarrollan a continuación.

I.3. Antecedentes del Eflujo Acido de Sinaptosomas.

El metabolismo aeróbico genera protones y el anaeróbico ácido láctico como productos de desecho, lo cual tiende a acidificar el

medio intracelular.

Se sabe que la concentración interna de protones en distintos tipos de células es diferente de la predicha por una distribución pasiva del ión. En cerebro se ha encontrado un pH intracelular entre 7.0 y 7.1, mientras que el pH externo se encuentra entre 7.3 y 7.4. El potencial de membrana de -80 mV corresponde en el equilibrio electroquímico de Nernst, a un pH interno de aproximadamente 6.0 (Siesjo, 1973). Existe por lo tanto un mecanismo de regulación del pH intracelular que consume energía y permite mantener la relación de concentración de protones en un estado estacionario fuera del equilibrio termodinámico.

Se han propuesto (Siesjo, 1973) cuatro mecanismos celulares para controlar el pH intracelular, que son los siguientes:

1. Regulación fisicoquímica por amortiguadores internos.
2. Captura de protones por organelos celulares.
3. Consumo o eliminación de ácidos metabólicos, i.e. ácido láctico
4. Eliminación ácida al exterior celular.

De las cuatro alternativas posibles, la eliminación al exterior tiene la ventaja de no alterar la capacidad amortiguadora de la célula. Cualquiera de las otras alternativas, hace uso de sistemas bioquímicos que pueden llegar a saturarse.

Por otro lado, en axón de calamar y de caracol, así como en músculo de percebes (Thomas R.C., 1976; Boron W.F. et al. 1976; Boron W.F., 1977), se han encontrado evidencias experimentales de cambios en el pH intracelular asociados a un flujo de eliminación ácida al exterior celular. En la Figura I-1 se esquematizan diferentes mecanismos de eliminación de protones. En el sistema nervioso central, utilizando sinaptosomas de rata, se ha encontrado un cambio en el pH intracelular dependiente de sodio externo (Comunicación personal, Dr. Daniel Naschen).

Las terminales nerviosas son pequeñas estructuras con una elevada relación de superficie a volumen (diámetro interno de 0.75 μm). Los cambios en la velocidad de eliminación del protón pueden entonces alterar drásticamente la concentración interna del mismo y en consecuencia alterar cualquier otra función fisiológica dependiente del pH intracelular. Resulta por lo tanto de interés estudiar los factores que regulan los cambios del pH intracelular, como es el flujo de protones. Evidencias experimentales indican que estas estructuras conservan las mismas propiedades fisiológicas que la célula intacta, como son: La existencia de un potencial de membrana cercano a -60 mV, la evidencia de canales de calcio sensibles a voltaje, del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (Blaustein y Ector, 1976) y de sistemas de recaptura de neurotransmisores dependientes del sodio externo (Kuhar 1973 y Martin 1973) o de sodio y cloruro (Sánchez-Armáss y Orrego 1977, 1978).

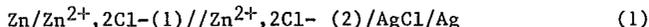
El objetivo de los experimentos que se mostrarán más adelante, es encontrar evidencias experimentales que permitan caracterizar dicho sistema de transporte en neuronas del sistema nervioso central de la rata.

II. POTENCIAL DE UNIÓN LÍQUIDA

II.1. Introducción.

Una celda electroquímica se compone de dos hemiceldas, cada una de las cuales está formada por el respectivo electrodo y electrolito. Cuando los dos electrodos pueden funcionar con el mismo electrolito, éste es suficiente para cerrar el circuito al colocar en el mismo recipiente los electrodos; en caso de que cada electrodo funcione con un electrolito diferente, los electrolitos deberán comunicarse entre sí a través de un puente salino, una unión líquida cualquiera o una amalgama.

La convención establecida (Mc Innes, 1961) para la notación de una celda es tal que, por ejemplo



La celda (1) está formada por el electrodo de zinc, en contacto con una solución de cloruro de zinc en concentración (1) y el electrodo de plata-cloruro de plata en otra solución de cloruro de zinc (2). Estas dos soluciones se comunican por una unión líquida o interfase electrolito//electrolito.

Una diagonal o (;) es una interfase, una coma separa dos componentes de una misma fase y dos diagonales representan una interfase cuyo potencial es considerado despreciable, tal como un puente salino o bien un vidrio poroso o cualquier otra unión líquida.

Para poder estudiar las características termodinámicas al equilibrio o bien los procesos cinéticos de la transferencia de carga que ocurren exclusivamente en un electrodo, es necesario hacer que las variables independientes afecten únicamente al electrodo de trabajo, mientras que el electrodo de referencia se mantenga en condiciones constantes.

La referencia primaria internacionalmente aceptada es el electrodo estándar de hidrógeno SHE. Dicha hemicelda se forma por el burbujeo de hidrógeno molecular con un electrodo de platino en una solución acuosa con protones en actividad 1 molar. Por convención a cualquier temperatura el potencial del SHE es de cero.

En el laboratorio usualmente se utiliza la celda de calomel como referencia, la cual está formada por mercurio en interfase con cloruro mercurioso. Esta hemicelda responde a cambios en la concentración de iones cloruro, según

$$E = E^{\circ} + (RT/F) \ln a_{\text{Cl}^{-}} \quad (2)$$

donde E: potencial de la hemicelda

E° : Potencial estándar.

R, T y F: Valores usuales.

$a_{\text{Cl}^{-}}$: Actividad de iones Cl^{-}

En la Tabla II-1 se muestran los potenciales del electrodo de calomel a diferentes temperaturas.

Los potenciales de electrodos están siempre asociados a una

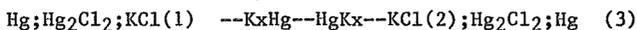
reacción química. Estas reacciones pueden estudiarse en condiciones de equilibrio termodinámico, en que las actividades de las especies químicas que participan en la reacción electroquímica

TABLA II-1
POTENCIAL DEL ELECTRODO DE CALOMEL (mV)

T (°C)	Concentración de KCl			
	Saturado	3.5N	1N	0.1N
0	260.2			
10	254.1	255.6		
20	247.7	252.0		
25	244.4	250.1	283	335.6
30	241.1	248.1		335.4
40	234.3	243.9		
50	227.2			
60	219.9			

Wescott (1978).

determinan el potencial del electrodo y por lo tanto la diferencia de potencial de la celda. Así por ejemplo, considérese la celda



E_1

E_2

que une dos soluciones de KCl de concentración diferente por medio de una amalgama de mercurio y potasio. Los potenciales de cada celda están determinados por

$$E_1 = E^0 + RT/F \ln a_{\text{Cl}^-1} \quad (4.a)$$

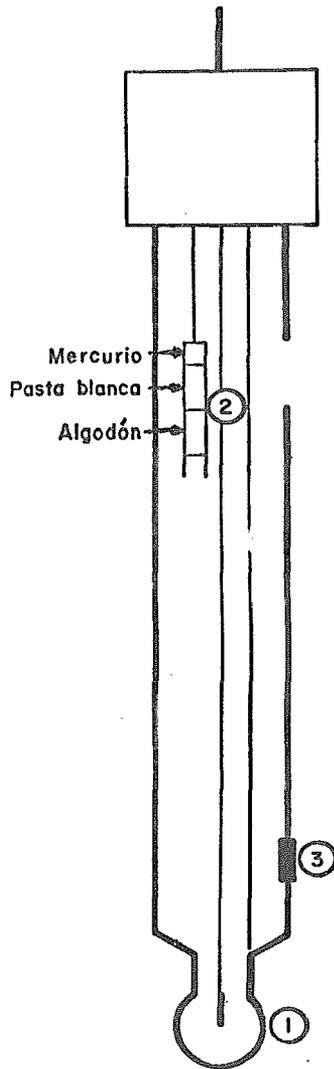
$$E_2 = E^0 + RT/F \ln a_{\text{Cl}^-2} \quad (4.b)$$

La diferencia de potencial $E_1 - E_2$ está dada por

$$E_1 - E_2 = RT/F \ln a_{\text{Cl}^-1} / a_{\text{Cl}^-2} \quad (5)$$

La determinación potenciométrica del pH se realiza en principio en condiciones de equilibrio termodinámico. Esto se logra efectivamente en celdas sin unión líquida. Sin embargo las determinaciones usuales en el laboratorio con el electrodo de vidrio, tienen un componente que no se encuentra en el equilibrio. En la Fig. II-1 se muestra el esquema de un electrodo de combinación que agrupa al electrodo de vidrio constituido por una membrana de vidrio en contacto con una solución estándar de HCl, la cual establece contacto con un alambre de platino y el electrodo de referencia de calomel inmerso en una solución saturada de KCl, que hace contacto con la solución de lectura por medio de una unión líquida formada por un vidrio poroso. Dicha celda se repre-

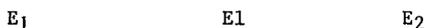
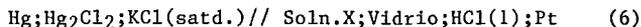
FIG. II-1



- ① Electrodo de vidrio
- ② Electrodo de calomel
- ③ Unión líquida

ELECTRODO DE COMBINACION

senta por



El potencial total E de la celda está determinado al menos* por la suma de los potenciales de electrodo de calomel, el de vidrio y el de la unión líquida que permite cerrar el circuito.

$$E = E_1 + E_1 + E_2 \quad (7)$$

Los potenciales E_1 y E_2 se encuentran en el equilibrio, con magnitudes que obedecen la relación de Nernst

$$E_1 = E^0 + RT/F \ln a_{\text{Cl}^-}(\text{KCl satd}) \quad (8.a)$$

$$E_2 = E^{0'} + RT/F \ln a_{\text{H}^+}(\text{Soln. X}) \quad (8.b)$$

Donde $E^{0'}$ es una constante que involucra el potencial estándar del electrodo y un término logarítmico de la actividad de la solución interna.

Sin embargo el potencial E_1 de la unión líquida, se encuentra fuera del equilibrio termodinámico. El potencial de unión líquida aparece debido a la diferente movilidad de los iones positivos y negativos a uno y otro lado de la membrana. La magnitud del potencial de unión líquida residual entre la lectura del estándar de ajuste del pH y la muestra, determina en gran medida el error de la determinación del pH. El tratamiento cuantitativo se desarrolla enseguida.

Se obtendrá inicialmente la expresión general, no integrada, del potencial de unión líquida. Esta se obtendrá de dos formas, a partir de una adecuación de la termodinámica clásica a una situación de no equilibrio y a partir de consideraciones de termodinámica de procesos irreversibles.

Enseguida se obtendrá el potencial de unión líquida para uniones del mismo electrolito y los fundamentos de la determinación experimental, lo cual será de gran utilidad para la comprensión de los resultados que se muestran en el capítulo IX.

Posteriormente se desarrollará la integración de la ecuación general del potencial de unión líquida para la unión de dos soluciones electrolíticas de diferente composición. Se muestra el desarrollo de Henderson, que es la aproximación más utilizada en la bibliografía.

II.2. Expresión General del Potencial de Unión Líquida.

Considérese un sistema formado por dos soluciones electrolíticas

* La aparición de otros potenciales adicionales como diferencias por agitación, el potencial de asimetría del electrodo de vidrio, o cualquier, otro involucra un error en la determinación potenciométrica del pH. (Mattock y Band, 1967).

que están en contacto entre sí de forma que a cierta distancia de la unión a uno y otro lado se conserva la concentración inicial de electrolitos de cada solución, en condiciones de temperatura y presión constantes. La función termodinámica adecuada para estudiar el sistema (Callen, 1960) es la energía libre de Gibbs, G. En cada solución, está definida la energía libre de Gibbs G_1 y G_2 correspondiente, con

$$G_1 = \sum_i n_{1i} \mu_{1i} \quad (9.a)$$

y

$$G_2 = \sum_i n_{2i} \mu_{2i} \quad (9.b)$$

Considerando que el movimiento de iones es suficientemente pequeño como para no alterar las concentraciones en cada solución, tenemos que para todo i

$$\mu_{1i} = \text{Cte.1} \quad (10.a)$$

$$\mu_{2i} = \text{Cte.2} \quad (10.b)$$

La variación de la energía libres se expresa entonces por

$$dG_1 = \sum_i \mu_{1i} dn_{1i} \quad (11.a)$$

$$dG_2 = \sum_i \mu_{2i} dn_{2i} \quad (11.b)$$

donde el movimiento de iones es de uno a otro lado de la membrana, por lo que

$$dn_{1i} = -dn_{2i} = dn_i \quad (12)$$

Con lo que la diferencia de energía libre en la celda por el desplazamiento de partículas en la unión líquida se expresa por

$$dG = dG_2 - dG_1 = \sum_i (\mu_{1i} - \mu_{2i}) dn_i \quad (13)$$

Al utilizar $dG = -nFdV$ (14)

en la expresión (13), podemos despejar el potencial de la forma

$$dV = -1/nF \sum_i n_i d\mu_i \quad (15)$$

donde

$$n = \sum_i n_i z_i \quad (16)$$

La relación (15) expresa el potencial ΔV de unión líquida que se genera por el flujo de n iones. Este es el flujo de transferencia de carga, o corriente, que ocurre en la unión líquida, responsable de cerrar el circuito entre los dos electrodos.

Denotemos por i dicha corriente total que fluye en la unión líquida. La fracción de corriente con la que un ión contribuye a la corriente total, se denomina (Mac Innes, 1961) número de transporte t_i

$$t_i = i_i / i_T \quad (17)$$

De forma que si pasa reversiblemente un faraday de carga, pasarán t_i/z_i moles del ión, es decir

$$n_i = t_i/z_i \quad (18)$$

Usando la relación

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i \quad (19)$$

donde, μ_i^0 : potencial estándar
 a_i : Actividad de la especie i.

y lo obtenido en (18), en la relación (15) tenemos

$$dV = - (RT/F) \sum t_i/z_i d \ln a_i \quad (20)$$

Al integrar entre los límites de la unión líquida, tendremos

$$\Delta V = \int dV = - (RT/F) \left(\sum t_i/z_i d \ln a_i \right) \quad (21)$$

Esta es la expresión general del potencial de unión líquida entre dos compartimentos.

Enseguida para fines ilustrativos, obtendremos la misma expresión general a partir de consideraciones de termodinámica de procesos irreversibles en su régimen lineal. Considérese para simplicidad del tratamiento un electrolito $M(z^+)A(z^-)$, donde z denota la valencia respectiva.

Los flujos de cada una de la especies iónicas, en el intervalo lineal están dados por

$$J^+ = L^{++}F^+ + L^{+-}F^- \quad (22.a)$$

$$J^- = L^{--}F^- + L^{-+}F^+ \quad (22.b)$$

donde L^{++} y L^{--} son los coeficientes directos o conductancias que relacionan de manera proporcional los flujos con las fuerzas F^+ y F^- respectivamente, mientras que L^{+-} y L^{-+} son los coeficientes cruzados.

Considerando un movimiento electroneutro en un elemento de volumen, la suma de los flujos unitarios positivo y negativo por la carga respectiva debe ser cero

$$q^+J^+ + q^-J^- = 0 \quad (23)$$

donde $q^+ = F z^+$ y $q^- = F z^-$

Las fuerzas termodinámicas que se consideran son por movimiento difusivo y por diferencia de potencial eléctrico, de forma que

$$F^+ = d\mu^+/dx + q^+dV/dx = F_{\text{difusiva}}^+ + F_{\text{el\u00e9ctrica}}^+ \quad (24.a)$$

$$F^- = d\mu^-/dx + q^-dV/dx = F_{\text{difusiva}}^- + F_{\text{el\u00e9ctrica}}^- \quad (24.b)$$

Al sustitu\u00edr las expresiones (22.a y b) en (25) tenemos

$$q^+(L^++F^+ + L^-+F^-) + q^-(L^{--}F^- + L^-+F^+) = 0$$

y reorganizando

$$F^+(q^+L^++ + q^-L^-+) + F^-(q^-L^{--} + q^+L^-+) = 0 \quad (25)$$

Definimos los flujos positivo y negativo por fuerza unitaria como

$$p^+ = q^+L^++ + q^-L^-+ \quad (26.a)$$

$$p^- = q^-L^{--} + q^+L^-+ \quad (26.b)$$

Vamos enseguida a expresar p^+ y p^- en funci\u00f3n de los n\u00fameros de transporte

$$t^+ = i^+/(i^+ + i^-) \quad \text{y} \quad t^- = i^-/(i^- + i^+) \quad (27.a \text{ y } b)$$

Evaluemos

$$p^+/(p^+ + p^-) = \frac{q^+L^++ + q^-L^-+}{q^+(q^+L^++ + q^-L^-+) + q^-(q^+L^-+ + q^-L^{--})} \quad (28)$$

Recu\u00e9rdese que los n\u00fameros de transporte est\u00e1n definidos en t\u00e9rminos del flujo exclusivo por gradiente el\u00e9ctrico, es decir

$$i^+ = q^+(J^+)_{\text{el\u00e9c}} ; \quad i^- = q^-(J^-)_{\text{el\u00e9c}} \quad (29)$$

Ahora bien, las relaciones (24 a y b) son v\u00e1lidas para cualquier condici\u00f3n de corrientes, en particular para aqu\u00e9llas correspondientes a los flujos asociados a una fuerza el\u00e9ctrica unitaria. Observando las relaciones (24) y (26), se deduce que los flujos asociados exclusivamente a una fuerza el\u00e9ctrica unitaria corresponden nuevamente a p^+ y p^- . Se tienen as\u00ed las respectivas corrientes el\u00e9ctricas por fuerza unitaria i^*

$$i^{*+} = q^+p^+ \quad ; \quad i^{*-} = q^-p^- \quad (30.a \text{ y } b)$$

Sustituyendo estos valores en la ecuaci\u00f3n (28) y haciendo uso de $q^+ = z^+F$, se tiene

$$\begin{aligned} \frac{p^+}{p^+ + p^-} &= \frac{i^{*+}/q^+}{q^+(i^{*+}/q^+) + q^-(i^{*-}/q^-)} \\ &= \frac{1}{z^+F} \frac{i^{*+}}{i^{*+} + i^{*-}} = t^+/(z^+F) \quad (31.a) \end{aligned}$$

De la misma forma puede obtenerse

$$p^+/(p^+q^+ + p^-q^-) = (1/z-F)(i^*/i^{*+} + i^{*-}) = t^+/(z-F) \quad (31.b)$$

Con lo que tenemos una relación entre las p^+ y p^- y los números de transporte. Regresando ahora a la condición de flujos electroneutros, ecuación (25), al expresar las fuerzas en su expresión desarrollada (24) tenemos

$$p^+(d\mu^+/dx) + p^+q^+(dV/dx) + p^-(d\mu^-/dx) + p^-q^-(dV/dx) = 0 \quad (32)$$

rearrreglando

$$(dV/dx)(p^+q^+ + p^-q^-) + p^+(d\mu^+/dx) + p^-(d\mu^-/dx) = 0 \quad (33)$$

Despejamos el gradiente eléctrico

$$-dV/dx = p^+/(p^+q^+ + p^-q^-)(d\mu^+/dx) + p^-/(p^+q^+ + p^-q^-)(d\mu^-/dx) \quad (34)$$

y utilizando la expresión (32)

$$-dV/dx = (t^+/z+F) d\mu^+/dx + (t^-/z-F) d\mu^-/dx \quad (35)$$

Si ahora extendemos el resultado para n iones

$$-dV/dx = \sum (t_i/z_i F) d\mu_i/dx$$

y utilizando la expresión del potencial químico, relación (19) llegamos nuevamente a

$$\Delta V = -\left(\frac{RT}{F}\right) \sum t_i/z_i c_i \ln a_i \quad (21)$$

la expresión general del potencial de unión líquida.

Hemos pues obtenido la expresión general del potencial de unión líquida (21) a partir de una adecuación de la termodinámica clásica y de termodinámica irreversible. Es importante hacer ver que la ecuación obtenida no es rigurosamente termodinámica, ya que describe el potencial de una unión líquida en función de actividades iónicas individuales, las cuales no pueden determinarse experimentalmente de manera directa. Se requiere una convención extratermodinámica que defina la actividad de un ión de referencia; recurso ampliamente utilizado en electroquímica.

II.3. Unión Líquida Homoiónica.

Consideremos una unión del tipo



formada por dos soluciones del mismo electrolito. De la ecuación (21) tenemos, en este caso

$$E = -\left(\frac{RT}{F}\right) \left[t_K \ln a_K + RT/F \int t_{Cl} \ln a_{Cl} \right] \quad (37)$$

donde el subíndice 1 hace referencia explícita al potencial de unión líquida. Puesto que

$$t_k + t_{c1} = 1 \quad (38)$$

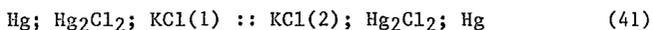
entonces

$$E_1 = -(RT/F) \int t_k \, d \ln a_k + RT/F \int (1-t_k) \, d \ln a_{c1} \quad (39)$$

reuniendo términos e integrando tenemos

$$E_1 = -(RT/F) \int t_k \, d \ln (a_k a_{c1}) + RT/F \ln a_{c1(2)}/a_{c1(1)} \quad (40)$$

Considérese la determinación experimental del potencial de una celda del tipo



$$E_1 \quad E_1 \quad E_2$$

Como se muestra en el capítulo IX, se utilizó la celda (41) para la determinación experimental del potencial de unión líquida, por lo que desarrollaremos aquí las consideraciones conceptuales necesarias.

El potencial E que genera la celda es la suma algebraica de los potenciales de cada electrodo más el de la unión líquida.

$$E = E_1 + E_2 + E_1 \quad (42)$$

donde por definición

$$E_1 = E^0 + RT/F \ln a_{Cl_1} \quad (43.a)$$

$$E_2 = - E^0 - RT/F \ln a_{Cl_2} \quad (43.b)$$

y el potencial de unión líquida es el obtenido en la ecuación (40). Al sumar los tres términos obtenemos

$$E = -(RT/F) \int t_k \, d \ln a_{c1} \quad (44)$$

Si ahora utilizamos la definición del coeficiente medio de actividad

$$a_{k1} = (a_K a_{Cl})^{1/2} \quad (45)$$

al sustituir en la ecuación (40) se obtiene

$$E = - (2RT/F) \int t_k \, d \ln a_{c1} \quad (46)$$

Si se hace la suposición de actividades iónicas iguales para los iones positivo y negativo, e iguales a la actividad media

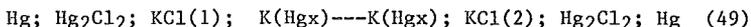
$$a_K = a_{Cl} = a_{KCl} \quad (47)$$

el potencial de la celda puede escribirse

$$E = E_t = -(2RT/F) \text{ tk} \ln a_{Cl(2)}/a_{Cl(1)} \quad (48)$$

donde el subíndice t hace mención al potencial de una celda con transferencia de carga.

En efecto si se realiza la determinación del potencial de una celda sin transferencia, como



donde la unión se forma con una amalgama de potasio y mercurio; el potencial de la celda está dado por la suma de los potenciales E_1 y E_2 , ecuaciones 43.a y b

$$E = (RT/F) \ln a_{Cl(1)}/a_{Cl(2)} \quad (50)$$

De la relación entre los potenciales de las celdas con y sin transferencia (48) y (50) puede obtenerse el número de transporte del potasio, o de manera general, del ión no reversible con los electrodos

$$\text{tk} = (1/2) E_t/E \quad (51)$$

II.4. Uniones Líquidas Heteroiónicas.

A continuación se presenta la integración de la ecuación (21) para el caso de una unión formada por dos electrolitos diferentes. Se desarrollará la aproximación de Henderson. Los resultados obtenidos deben asimismo ser utilizables para soluciones del mismo electrolito.

Se ha encontrado experimentalmente que las uniones heteroiónicas tienen un potencial que depende de la forma de elaborar la unión líquida, es decir, de las condiciones a la frontera así como de las condiciones en que ocurre la difusión en la unión.

4.1 Integración de Henderson

La integración realizada por Henderson (1907, 1908) requiere de tres suposiciones básicas:

- i) Aproxíma actividades iónicas a concentraciones.
- ii) Considera un gradiente o perfil de concentraciones lineal para cualquier electrolito en la unión líquida.
- iii) Considera el número de transporte independiente de las concentraciones.

Denotemos por C_1^1 y C_1^2 las concentraciones en las soluciones 1 y 2 del iésimo ión, respectivamente. El perfil lineal de concentraciones indica que la concentración a una fracción de distancia x en la unión líquida, se expresa por

$$C_i = C_{i1} + (C_{i2} - C_{i1})x = (1-x)C_{i1} + xC_{i2} \quad (52)$$

de donde

$$dC_i = (C_{i2} - C_{i1}) dx \quad (53)$$

El número de transporte (Bockris y Reddy, 1977) puede expresarse

de la forma

$$t_i = u_i c_i / \sum u_i c_i \quad (54)$$

donde u_i expresa la movilidad del ión i
Sustituyendo la relación (52) en la (54), tenemos

$$t_i = \frac{u_i c_i}{(1-x) \sum C_{1i} u_i + x \sum C_{2i} u_i} = \frac{u_i c_i}{\sum C_{1i} u_i + x \sum u_i (C_{2i} - C_{1i})} \quad (55)$$

La expresión (24) del potencial de unión líquida, considerando concentraciones y no actividades y sustituyendo lo obtenido en (53) se transforma a

$$E_l = -(RT/F) \int \sum t_i / z_i (C_{2i} - C_{1i}) / C_i dx \quad (56)$$

Utilizando la expresión (55) del número de transporte, tenemos

$$E_l = -(RT/F) \int \sum \frac{u_i / z_i (C_{2i} - C_{1i})}{\sum u_i C_{1i} + x \sum u_i (C_{2i} - C_{1i})} dx \quad (57)$$

Consideremos la integral de un ión, sea E_{l1} el potencial de unión líquida correspondiente, tenemos

$$E_{l1} = -(RT/F) \int \frac{u_1 / z_1 (C_{21} - C_{11})}{\sum u_i C_{1i} + x \sum u_i (C_{2i} - C_{1i})} dx \quad (58)$$

Denotemos para facilidad de manejo

$$\begin{aligned} A &= u_1 (C_{21} - C_{11}) & f &= B + Cx \text{ entonces} \\ B &= \sum u_i C_{1i} & df &= C dx \text{ y } dx = (1/C) df \\ C &= \sum u_i (C_{2i} - C_{1i}) & \text{ y } & Adx = (A/C) df \end{aligned}$$

La expresión (58) es una integral de la forma

$$\begin{aligned} E_{l1} &= -(RT/F) \frac{1}{z_1} \int \frac{Adx}{(B + Cx)} = -(RT/F) z_1 \frac{A}{C} \int \frac{df}{f} \\ &= -(RT/F) \frac{A}{z_1 C} \ln f_2 / f_1 \quad (59) \end{aligned}$$

donde $f_2 = \sum u_i C_i + x \sum u_i (C_{2i} - C_{1i})$

De la ecuación (52), multiplicando primero por u_i y sumando enseguida sobre i , se tiene que

$$\text{en } x_2: \quad \sum u_i C_{i2} = \sum u_i C_{i1} + x \sum u_i (C_{i2} - C_{i1}) = f_1 \quad (60.a)$$

$$\text{y en } x_1: \quad \sum u_i C_{i1} = \sum u_i C_{i1} + x \sum u_i (C_{i2} - C_{i1}) = f_2 \quad (60.b)$$

de donde, sustituyendo los valores en (40) se tiene que

$$E_{I1} = -(RT/F) - \frac{u_i/z_i (C_{i2} - C_{i1})}{\sum u_i (C_{i2} - C_{i1})} \ln \frac{\sum u_i C_{i2}}{\sum u_i C_{i1}} \quad (61)$$

Al considerar la suma de integraciones para todos los iones, se llega a

$$E_I = -(RT/F) \frac{\sum u_i/z_i (C_{i2} - C_{i1})}{\sum u_i (C_{i2} - C_{i1})} \ln \frac{\sum u_i C_{i1}}{\sum u_i C_{i2}} \quad (62)$$

la expresión de Henderson para el potencial de unión líquida.

Para el caso de iones todos monovalentes, se define para facilidad de expresión, las sumas de los respectivos iones positivos U_1 y U_2 a cada lado de la unión y de los negativos por V_1 y V_2 , así

$$U_1 = \sum C_{+1} u^+ \quad U_2 = \sum C_{+2} u^+ \quad (63.a)$$

$$V_1 = \sum C_{-1} u^- \quad V_2 = \sum C_{-2} u^- \quad (63.b)$$

Con lo que el primer factor de la relación (62), se expresa por

$$\frac{\sum u_i/z_i (C_{i2} - C_{i1})}{\sum u_i (C_{i2} - C_{i1})} = \frac{U_2 - U_1 - (V_2 - V_1)}{U_2 - U_1 + V_2 - V_1} = \frac{(U_1 - U_2) - (U_2 - V_2)}{(U_1 + V_1) - (U_2 + V_2)} \quad (64)$$

y el potencial de unión líquida queda en la forma más reconocible

$$E_I = RT/F \frac{(U_1 - V_1) - (U_2 - V_2)}{(U_1 + V_1) - (U_2 + V_2)} \ln \frac{U_1 + V_1}{U_2 + V_2} \quad (65)$$

Para el caso en que una solución sea KCl saturado, el potencial de unión líquida se expresa a 25°C, en volts por (Bates, 1973, Cap.3):

$$E_I = 0.05916 \frac{U_1 - V_1 + 11.6}{U_1 + V_1 - 623} \log \frac{U_1 + V_1}{623} \quad (66)$$

Si las soluciones 1 y 2 están constituidas por el mismo electrolito a diferentes concentraciones, tendremos que

$$C_{+1} = C_{-1} = C_1 \quad \text{y} \quad C_{+2} = C_{-2} = C_2$$

con lo que la expresión (65) se reduce a

$$E_1 = (RT/F) \frac{U_+ - U_-}{U_+ + U_-} \ln \frac{C_1}{C_2} \quad (67)$$

Al expresarlo en términos del número de transporte

$$t_+ = 1 - t_- = u_+ / (u_+ + u_-)$$

llegamos a

$$E_1 = (2t_+ - 1)(RT/F) \ln \frac{C_1}{C_2} \quad (68)$$

relación que puede obtenerse al integrar la ecuación (39) considerando concentración en vez de actividades y números de transporte independientes de la concentración. Obsérvese que en este caso el resultado es independiente del perfil de concentraciones y de las condiciones a la frontera.

III. ORIGEN DEL POTENCIAL DEL ELECTRODO DE VIDRIO.

El origen del potencial del electrodo de vidrio se atribuya, o bien a un potencial de la interfase vidrio-electrolito o bien a la difusión iónica al interior del vidrio. Los trabajos de Eisenman en electrodos de vidrio selectivos al potasio y al sodio, han mostrado que el electrodo de vidrio "no es ni más ni menos que una membrana de intercambio catiónico perfectamente semipermeable" cuyo potencial es la suma de las contribuciones de difusión iónica al interior e intercambio en la superficie. (Eisenman, 1967).

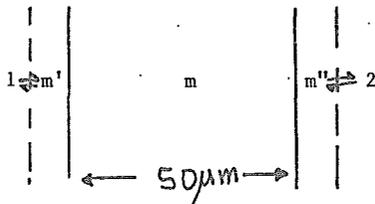
La determinación experimental de la constante de equilibrio del intercambio iónico y de las movilidades iónicas en el vidrio, han permitido establecer la contribución separadamente del potencial de superficie y del potencial de difusión.

El potencial de difusión se encuentra en oposición respecto al potencial total, a diferencia del potencial de superficie.

A continuación, partiendo de un modelo del electrodo de vidrio sensible a protones desarrollaremos las expresiones básicas del tratamiento de Eisenman, bajo la suposición de un intercambio Na^+/H^+ en el vidrio y de la difusión exclusiva del sodio en el vidrio. Es importante mencionar que en principio este desarrollo vale para cualquier par de cationes, aunque como mencionamos anteriormente, los estudios más profundos se han desarrollado para el par Na^+/K^+ .

Como mencionamos, el potencial del electrodo de vidrio está formado por la contribución de varios componentes. El vidrio, que puede ser de 50 μm de grosor, es impermeable a los H^+ , el transporte de carga al interior ocurre por el desplazamiento de iones móviles al interior del vidrio como Na^+ o Li^+ . A ambos lados del vidrio se encuentra una zona de hidratación del silicato constitutivo del vidrio; cada región de hidratación se encuentra rodeada de las respectivas soluciones a cada lado del vidrio. El esquema es el siguiente:

Solución Problema zonas hidratadas Solución interna
vidrio seco



El potencial aparece ya que el silicato tiene cierta afinidad por cationes que se adsorben o desorben de la región de hidratación, esto genera una separación de cargas que altera la diferencia de potencial interfacial. Así la membrana de vidrio puede no ser permeable en absoluto al ión principal, H^+ en este caso, sin embargo si dicho ión es el que domina la transferencia de carga en las regiones interfaciales, el potencial generado será selectivo al ión.

En las zonas interfaciales el equilibrio se alcanza muy rápidamente, de forma que cada catión adsorbido en una interfase se reflejará inmediatamente en la otra. Al interior del vidrio, zona m, suponemos que la conducción está dada por un único ión, el sodio. La membrana de vidrio comprende 5 fases, el potencial total generado será la suma de las respectivas diferencias de potencial de las uniones entre cada fase, así

$$E_m = (V_2 - V_m'') + (V_m'' - V_m) + (V_m - V_m') + (V_m' - V_1) \quad (1)$$

En el equilibrio termodinámico entre las soluciones y la fase hidratada del vidrio se satisfacen las relaciones

$$\mu_{H^+1} = \mu_{H^+m} \quad (2)$$

$$\mu_{Na^+1} = \mu_{Na^+m} \quad (3)$$

Al desarrollar el potencial electroquímico para el protón, tenemos de la relación (2)

$$\mu_{H^+1}^0 + RT \ln a_{H^+1} + FV_1 = \mu_{H^+m}^0 + RT \ln a_{H^+m} + zFV_m' \quad (4)$$

De donde despejamos la diferencia de potencial

$$(V_m' - V_1) = \frac{\mu_{H^+1}^0 - \mu_{H^+m}^0}{F} + (RT/F) \ln \frac{a_{H^+1}}{a_{H^+m}'} \quad (5)$$

De forma análoga para las fases m' y 2, se obtiene $V_2 - V_m''$. (6)

Donde $\mu_{H^+1}^0 = \mu_{H^+2}^0$ (7.a)

así como

$$\mu_{H^+m}^0 = \mu_{H^+m''}^0 \quad (7.b)$$

La segunda y tercera diferencia de potencial que contribuyen en (1) son potenciales de unión, del tipo de potencial de difusión que se estudió en el capítulo II donde se obtuvo la ecuación (62) de Henderson. Haciendo uso de la ecuación de Henderson, para el caso de solo dos iones univalentes, tenemos

$$V_m - V_m' = E_j = (RT/F) \ln \frac{(u_{H^+})a_{H^+m}' + (u_{Na^+})a_{Na^+m}'}{(u_{Na^+})(a_{Na^+m})} \quad (8)$$

donde u_{H^+} y u_{Na^+} son las movilidades de los respectivos iones y a_{H^+} , a_{Na^+} denotan las actividades.

Ya que el primer término de la ecuación de Henderson vale uno para este caso y por otro lado en el denominador del logaritmo solo aparece el sodio, por ser el único ión conductor de la fase

m del vidrio. De la misma manera para la interfase entre m'' y m

$$V_m'' - V_m = (RT/F) \ln \frac{(u_{Na^+})(a_{Na^+}_m)}{(u_{H^+})(a_{H^+}_m'') + (u_{Na^+})(a_{Na^+}_m'')} \quad (9)$$

Podemos ahora realizar la suma de las distintas contribuciones (5), (6), (8) y (9) al potencial total E_m a través de la membrana de vidrio

$$E_m = (RT/F) \ln \frac{a_{H^+}_1 a_{H^+}_m''}{a_{H^+}_2 a_{H^+}_m'} + (RT/F) \ln \frac{(u_{Na^+} u_{H^+})}{(u_{Na^+}/u_{H^+})(a_{Na^+}_m' a_{H^+}_m'')} \quad (10)$$

El primer término es la suma de (6) y (7) y el segundo la suma de (8) y (9). El logaritmo del segundo término se obtiene fácilmente al observar que el denominador en (8) es igual al numerador en (9) y además al dividir entre u_{H^+} se dejan las actividades de los protones en 1 y 2 como términos separados.

Enseguida dividimos ambos términos logarítmicos, numerador y denominador, entre $(a_{H^+}_m')(a_{H^+}_m'')$ y los reunimos en uno solo

$$E_m = (RT/F) \ln \frac{(u_{Na^+}/u_{H^+})(a_{H^+}_1 a_{Na^+}_m'/a_{H^+}_m') + a_{H^+}_1}{(u_{Na^+}/u_{H^+})(a_{H^+}_2 a_{Na^+}_m''/a_{H^+}_m'') + a_{H^+}_2} \quad (11)$$

Por otro lado, considérese la suma de las condiciones de equilibrio (2) y (3)

$$\mu_{H^+}_1 + \mu_{Na^+}_1 = \mu_{H^+}_m' + \mu_{Na^+}_m' \quad (12)$$

Esta suma expresa la condición de equilibrio de una reacción de intercambio iónico



ecuación que no involucra transferencia de carga neta, por lo que su constante de equilibrio deberá ser independiente del potencial eléctrico. De esta forma puede definirse

$$K(H^+, Na^+) = \frac{a_{H^+}_1 a_{Na^+}_m'}{a_{H^+}_m' a_{Na^+}_1} \quad (13)$$

como una constante independiente de los valores del potencial. De la misma manera entre 2 y m'' , se define una constante de equilibrio con el mismo valor numérico que entre 1 y m' .

Puesto que $K(H^+, Na^+)$ y u_{Na^+}/u_{H^+} son constantes características del sistema, se define su producto $k_{pot}(H^+, Na^+)$, como el coeficiente potenciométrico selectivo

$$k_{\text{pot}}(\text{H}^+, \text{Na}^+) = K(\text{H}^+, \text{Na}^+) \frac{u_{\text{Na}^+}}{u_{\text{H}^+}}$$

Haciendo uso de estas definiciones, a partir de la relación (11) tenemos finalmente

$$E_m = (RT/F) \ln \frac{k_{\text{pot}}(\text{H}^+, \text{Na}^+) a_{\text{Na}^+1} + a_{\text{H}^+1}}{k_{\text{pot}}(\text{H}^+, \text{Na}^+) a_{\text{Na}^+2} + a_{\text{H}^+2}} \quad (16)$$

Si la solución interna de referencia es la solución 2 y la solución 1 es la de prueba, el potencial puede expresarse como

$$E_m = \text{Cte} + (RT/F) \ln \left(a_{\text{H}^+1} + k_{\text{pot}} a_{\text{Na}^+1} \right) \quad (17)$$

La membrana es selectiva al sodio y al protón. Cuando $k_{\text{pot}}(\text{H}^+, \text{Na}^+)$ es muy pequeño, de forma que el producto ($k_{\text{pot}} a_{\text{Na}^+}$) sea despreciable frente a a_{H^+} , la membrana responde esencialmente solo al protón. En este caso el intercambio de cargas entre 1 y 2 está dominado exclusivamente por el H^+ .

De esta forma hemos obtenido una relación nernstiana entre el potencial de membrana de vidrio y la actividad de protones, a_{H^+} a partir de considerar solo dos iones Na^+ y H^+ . Los electrodos de vidrio responden a otros iones como Li^+ , K^+ , Ag^+ , NH_4^+ , con sus respectivos coeficientes potenciométricos de selectividad.

De manera general se tiene un intercambio iónico, donde 1 y 2 son dos cationes cualquiera, una prima representa la solución y dos el ión en el vidrio o intercambiador iónico

$$i'' + j' \rightleftharpoons i' + j'' \quad (18)$$

La constante de equilibrio, análoga a la ecuación (14) es ahora

$$K = i'j''/i''j' = (i'/j')_{\text{soln.}} \cdot (i'/j')_{\text{vidrio}} \quad (19)$$

y el coeficiente potenciométrico selectivo

$$k_{\text{pot}}(i, j) = K u_j / u_i \quad (20)$$

Sin embargo el potencial del electrodo de vidrio en mezclas de dos iones, se ha encontrado (Eisenman et al., 1957) definido empíricamente por

$$E = (RT/F) \ln \frac{(a_j^{1/n} k_{\text{pot}})^{1/n} + a_i^{1/n}}{(a_j^n k_{\text{pot}})^{1/n} + a_i^{1/n}} \quad (21)$$

donde

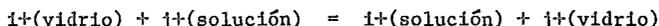
$$k_{pot} = K(u_j/u_i)^n \quad (22)$$

k_{pot} , i , j y n son parámetros empíricos característicos del vidrio y del par iónico. Eisenman ha estudiado vidrios selectivos a sodio y potasio, para los cuales $n=1$. El cociente de movilidades u_j/u_i los determinó por la obtención de los coeficientes de difusión, utilizando Na^{+24} y K^{+42} .

Es importante mencionar asimismo que la determinación del potencial de superficie coincide con los estudios de selectividad iónica de intercambiadores iónicos, que dieron por resultado las secuencias de selectividad iónica de Eisenman.

Con el objeto de ilustrar mejor el parámetro k_{pot} procederemos a resumir los conceptos básicos de dicha teoría.

La determinación de las secuencias de selectividad parten de la evaluación teórico-experimental del cambio en la energía libre de Gibbs de la reacción de intercambio del tipo de (18)



Se separan dos contribuciones, de forma que

$$\Delta G = -RT \ln K_{ij} = (G_i - G_j)_{\text{acuoso}} - (G_i - G_j)_{\text{vidrio}} \quad (23)$$

la energía libre es la suma algebraica de la energía de hidratación de los iones, más la energía de interacción de los iones con el vidrio.

El término de hidratación se obtiene experimentalmente, mientras que el término de interacción con el vidrio fue calculado por Eisenman. Para dicho cálculo se consideró únicamente la contribución coulombica utilizando modelos atómicos simples de la estructura del vidrio de silicato o de aluminosilicato.

Los resultados obtenidos muestran que el orden de selectividad iónica depende de la magnitud del campo aniónico del vidrio. La hidratación altera el grado pero no el orden de la selectividad. De esta forma se utiliza un solo parámetro para caracterizar la selectividad del vidrio frente a los diferentes iones, que es $k_{pot}(i,j)$ donde i y j representan dos cationes cualesquiera. La magnitud de $\log k_{pot}(i,j)$ dependiendo de la magnitud del campo eléctrico y del par iónico puede ir desde -7 hasta $+6$ aproximadamente. (Eisenman, 1966).

IV. DEFINICION OPERACIONAL DEL pH.

El trabajo de la tesis se limita al pH de soluciones acuosas. El agua se disocia en



protones e hidroxilos, de forma que en cualquier solución acuosa siempre se tendrá que satisfacer el equilibrio de disociación (1). La constante de equilibrio termodinámica se expresa por

$$K_{eq.} = (\text{H}_3\text{O}^+)(\text{OH}^-) / \text{H}_2\text{O} \quad (2)$$

La concentración de moléculas de agua no disociadas puede considerarse prácticamente constante. Se define así el producto iónico del agua

$$K = (\text{H}_3\text{O}^+)(\text{OH}^-) \quad (3)$$

el cual es función de la temperatura. (ver Ramette, 1983, Cap. 4).

IV.1. Noción de pH.

El danés Sorensen definió el pH en 1909 en dos artículos publicados simultáneamente en francés y en alemán, llamado el "exponente del ión hidrógeno"; utilizando la primera letra de Potenz, puissance, power o poder. Se definió inicialmente en términos de la concentración

$$\text{pH} = - \log C(\text{H}^+) \quad (4)$$

Más adelante el mismo Sorensen y Linderstrom-Lang (1924) definieron el pH en términos de la actividad del protón

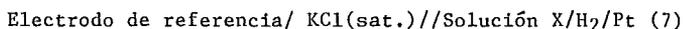
$$\text{pH} = - \log a (\text{H}^+) \quad (5)$$

Tomando en consideración la constante de disociación del agua, que permite una concentración mínima de protones de 10^{-14} M y máxima de 10 M a temperaturas ordinarias, la escala de pH toma valores extremos de -1 a 15 unidades.

La definición del pH en términos de la actividad del protón es una definición de la noción del pH, pero puesto que involucra una sola actividad iónica, no es medible. Como se ha mencionado anteriormente, no es posible medir experimentalmente propiedades electroquímicas de iones aislados. Esto obliga a elaborar una definición operacional del pH, en términos de la operación o método utilizado para medirlo.

IV.2. Definición Operacional del pH.

Se determina la fuerza electromotriz E(X) de la celda



y la fuerza electromotriz E(S) de la celda

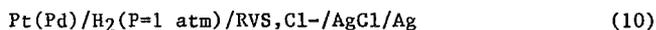
Electrodo de referencia/KCl(sat.)//Solución S/H₂/Pt (8)

ambas a la misma temperatura y en condiciones idénticas de los respectivos electrodos de referencia y de hidrógeno, así como el mismo puente salino con no menos de 3.5 mol/kg. El pH de la solución, denominado pH(X) se define en términos del pH(S) de la solución estándar de referencia, por

$$\text{pH}(X) = \text{pH}(S) + \frac{E(S) - E(X)}{RT/F \ln 10} \quad (9)$$

IV.3. Soluciones Estándar de Referencia.

La solución 0.05 mol/kg de ftalato ácido de potasio es el llamado estándar de pH de valor de referencia (RVS) en la escala internacional del pH. El pH(RVS) se determina a partir de una celda sin unión líquida



en cinco pasos, que son los siguientes:

i) Se determina la pendiente a partir de la fuerza electromotriz E de la celda (10), a partir de

$$-\log m_{\text{H}}^{\gamma} \text{H}^{\gamma} \text{Cl} = (E - E^{\circ})/k + \log m \quad (11)$$

donde m_{H} : molalidad de protones.
 γ_{H} : coeficiente de actividad del protón
 γ_{Cl} : coeficiente de actividad del cloruro
 m : molalidad

ii) Se extrapola $-\log m_{\text{H}}^{\gamma} \text{H}^{\gamma} \text{Cl}$ a $m=0$, para quitar así el efecto del cloruro. Este valor extrapolado se denomina $p(\text{aH}^{\gamma} \text{Cl})^{\circ}$

$$p(\text{aH}^{\gamma} \text{Cl})^{\circ} = -\log (m_{\text{H}}^{\gamma} \text{H}^{\gamma} \text{Cl})^{\circ} \quad (12)$$

iii) Se define por convención el coeficiente de actividad del cloruro. La escala internacional del pH tiene por convención la ecuación de Bates-Guggenheim (1960)

$$-\log \gamma_{\text{Cl}} = \frac{\Delta I^{1/2}}{1 + 1.5 I^{1/2}} \quad (13)$$

iv) Con los valores de las expresiones (12) y (13), se obtiene finalmente el pH(S)

$$\text{pH}(S) = p(\text{aH}^{\gamma} \text{Cl})^{\circ} + \log \gamma_{\text{Cl}}$$

v) Finalmente se realizan determinaciones a diferentes temperaturas y se suaviza la dependencia en la temperatura, para que obedezcan a una relación del tipo

$$\text{pH(S)} = A/T + B + CT + DT^2 \quad (14.a)$$

$$\text{pH(S)} = \text{pH(S)}_{298} + b(T-298) + c(T-298)^2 \quad (14.b)$$

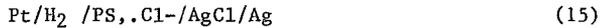
Los valores del estándar pH(RVS) a diferentes temperaturas se muestran en la Tabla IV-1.

TABLA IV-1.
ESTANDAR pH (RVS).

T(°C)pH	T(°C)pH	T(°C)pH
0 4.000	35 4.018	65 4.097
5 3.998	37 4.022	70 4.116
10 3.997	40 4.027	75 4.137
15 3.998	45 4.038	80 4.159
20 4.001	50 4.050	85 4.183
25 4.005	55 4.064	90 4.21
30 4.011	60 4.080	95 4.24

Covington et al. 1985.

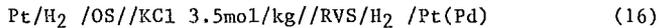
Enseguida la escala internacional define los estándares primarios de pH(PS) que se elaboran con sustancias que satisfacen ciertos criterios de preparación pura, estabilidad, en el intervalo de pH de 3 a 11 y con un potencial de unión líquida residual pequeño. Se han definido 7 estándares a partir de las determinaciones sin unión líquida en la celda (15)



Estos valores se asignan por el mismo procedimiento ya mencionado. Los valores asignados de pH(PS) van de 0 a 95°C como temperaturas extremas, como se muestra en la Tabla IV-2.

Debido a que la definición de los pH(PS) está determinada por el potencial de la celda (15) y ya que cada estándar tiene una fuerza iónica y composición química diferentes, esta escala de pH no será totalmente congruente al utilizarse en una celda con unión líquida por el error del potencial de unión líquida diferente para cada estándar.

Una escala más útil para el pH obtenido en celdas con unión líquida, es la de los estándares operacionales, pH(OS) que se obtienen del potencial de la celda con unión líquida



Es decir, que los valores establecidos de pH(OS) son tales que

$$\text{pH(OS)} = \text{pH(PS)} + E_j \quad (17)$$

la magnitud del potencial de unión líquida residual respecto al del estándar de valor de referencia, se incorpora al valor asignado del estándar. El potencial de unión líquida está establecido que debe formarse con un capilar de vidrio de 1mm de diámetro, ya

TABLA IV-2

VALORES DE pH (PS) DE SOLUCIONES DE REFERENCIA DE ESTANDARES PRIMARIOS.*

	t/°C															
	0	5	10	15	20	25	30	35	37	40	50	60	70	80	90	95
Tartrato de potasio saturado (a 25°C)	-	-	-	-	-	3.557	3.552	3.549	3.548	3.547	3.549	3.560	3.580	3.610	3.650	3.674
Citrato de potasio dihidrogenado 0.1 mol/kg	3.863	3.840	3.820	3.802	3.788	3.776	3.766	3.759	3.756	3.754	3.749	-	-	-	-	-
0.025 mol/kg fosfato disódico + 0.025 mol/kg fosfato monobásico de potasio	6.984	6.951	6.923	6.900	6.881	6.865	6.853	6.844	6.841	6.838	6.833	6.836	6.845	6.859	6.876	6.886
0.03043 mol/kg fosfato dibásico de sodio + 0.008695 mol/kg fosfato monobásico de potasio	7.534	7.500	7.472	7.448	7.429	7.413	7.400	7.389	7.386	7.380	7.367	-	-	-	-	-
0.01 mol/kg tetraborato disódico	9.464	9.395	9.332	9.276	9.225	9.180	9.139	9.102	9.088	9.068	9.011	8.962	8.921	8.884	8.850	8.833
0.025 mol/kg carbonato sódico + 0.025 mol/kg carbonato monobásico	10.317	10.245	10.179	10.118	10.062	10.012	9.966	9.926	9.910	9.889	9.828	-	-	-	-	-

NOTA: Basado en una incertidumbre de ± 0.2 mV en la determinación de (E-E°);
la incertidumbre es de ± 0.003 en pH en el intervalo de 0 a 50°C.

* Covington et al. 1985.

dicha geometría genera un potencial de unión líquida bien definido y reproducible. Este potencial se denomina potencial de unión líquida residual convencional y aparece por 1000, debajo de los valores de pH(OS) en la Tabla IV-3. Se recomienda como alternativa (Covington et al.1985) el uso de vidrio de porosidad grado 4 para las uniones líquidas. La incertidumbre aceptada en el valor del pH (Covington et al.1985) es de ± 0.02 unidades de pH, que corresponde al 3.9% en concentración.

Es importante señalar que la mayoría de los diseños comerciales de unión líquida no tienen una geometría que permita obtener una buena reproducibilidad en el pH leído. La escala británica de pH (Covington, 1981) se basa en un sólo estándar primario, el ftalato ácido de potasio determinado en celda sin unión líquida y varios estándares secundarios u operacionales, obtenidos en celdas con unión líquida. En principio esta escala tiene la ventaja de ser más congruente que la internacional, pero la interpretación del pH en términos de la concentración o actividad de protones se dificulta más.

La escala internacional del pH no se compromete explícitamente con una interpretación del pH en términos de la actividad de protones. Esta interpretación para ambas escalas está limitada para soluciones homoiónicas de fuerza iónica no mayor de 100 mM, que es el límite máximo de concentración en que tiene validez el tratamiento de Debye-Hückel; por lo que dicha escala no se aplica para muestras de plasma sanguíneo, suero, sangre completa u orina. Para estas muestras se recomienda el uso de un estándar de fosfatos de fuerza iónica (I) 100mM, (Bower et al. 1961) ó 0.13M (Semple et al. 1962) o bien de Tris con NaCl I=160 mM (Durst y Staples, 1972).

En el agua de mar el problema es aún mayor ya que la fuerza iónica es del orden de 700 mM; suelen utilizarse tres escalas diferentes (Bates, 1982), una basada en la actividad de protones, otra en la concentración de protones libres y la última en la concentración total de protones libres más los combinados con el sulfato presente en el agua de mar.

En resumen se observa que la definición del pH útil experimentalmente es la definición operacional, que incorpora el método de medida en la definición misma. Esta definición operacional se fundamenta en la convención de Bates-Guggenheim que es una modificación del tratamiento de Debye-Hückel, para el coeficiente de actividad del ión cloruro. La validez del tratamiento de Debye se limita a electrolitos puros ya que no toma en consideración las interacciones específicas entre iones, en el límite máximo de 100 mM de fuerza iónica. Esto indica claramente cuan alejados estamos de hacer una interpretación correcta del pH en términos de la actividad de los protones, en soluciones de interés bioquímico.

IV. 4. Pendiente o eficiencia electromotriz.

Existen actualmente seis diferentes soluciones de referencia

TABLA IV-3.

VALORES DE pH (OS) DE SOLUCIONES DE REFERENCIA DE ESTANDARES OPERACIONES.*

0.1 mol/kg tetraoxalato de potasio.	-	-	-	-	1.475	1.479	1.483	1.490	1.493	1.503	1.513	1.52	1.53	1.53	1.53
0.05 mol/kg tetraoxalato de potasio.	-	-	1.638 32	1.642 30	1.644 31	1.646 33	1.648 35	1.649 42	1.650 44	1.653 54	1.660 63	1.671 72	1.689 77	1.72 72	1.73 76
0.05 mol/kg diglicolato Na-H.	-	3.466 9	3.470 17	3.476 15	3.484 15	3.492 17	3.502 18	3.519 18	3.527 21	3.558 22	3.595 24	-	-	-	-
Tartrato K-H std (a 25°C).	-	-	-	-	-	3.556 1	3.549 3	3.544 4	3.542 5	3.544 5	3.553 7	3.570 10	3.596 13	3.627 23	3.649 25
0.05 mol/kg Ftalato de K (RVS).	4.000	3.998	3.997	3.998	4.000	4.005	4.011	4.022	4.027	4.050	4.080	4.115	4.159	4.21	4.24
0.1 mol/dm ³ Ac. acético + 0.1 mol/dm ³ acetado de sodio.	4.664 19	4.657 16	4.652 13	4.647 9	4.645 17	4.644 10	4.643 21	4.647 11	4.650 12	4.663 12	4.684	4.713	4.75	4.80	4.83
0.01 mol/dm ³ acético + 0.01 mol/dm ³ acetato de sodio.	4.729 8	4.722 8	4.717 8	4.714 8	4.712 8	4.713 7	4.715 7	4.722 5	4.726 4	4.743 2	4.768	4.800	4.839	4.88	4.91
0.02 mol/kg fosfato-piperazina.	-	6.477 38	6.419 34	6.364 30	6.310 28	6.259 25	6.209 25	6.143 24	6.116 24	6.030 28	5.952	-	-	-	-
0.025 mol/kg fosfato dibásico + .025 mol/kg fosfato monobásico de potasio.	6.961 23	6.935 16	6.912 11	6.891 9	6.873 8	6.857 8	6.843 10	6.828 13	6.823 15	6.814 19	6.817 19	6.830 16	6.85 0	6.90 -23	6.92 -34
0.03043 mol/kg fosfato dibásico + 0.008695 mol/kg fosfato monobásico de potasio.	7.506 23	7.482 18	7.460 12	7.441 7	7.423 6	7.406 7	7.390 10	7.369 16	-	-	-	-	-	-	-
0.04 mol/kg fosfato dibásico + 0.01 mol/kg fosfato monobásico de potasio.	-	7.512	7.488	7.466	7.445	7.428	7.414	7.404	-	-	-	-	-	-	-
0.05 mol/kg Tris-HCl + 0.01667 mol/kg Tris.	8.399 72	8.238 65	8.083 58	7.933 55	7.788 52	7.648 52	7.513 50	7.332 50	7.257 52	7.018 52	6.794	-	-	-	-
0.05 mol/kg Tetraborato disódico.	9.475 35	9.409 23	9.347 17	9.288 15	9.233 12	9.182 12	9.134 15	9.074 19	9.051 20	8.983 25	8.932 24	8.898	8.88	8.84	8.89
0.01 mol/kg Tetraborato disódico.	9.451 33	9.388 7	9.329 3	9.275 3	9.225 0	9.179 1	9.138 1	9.086 2	9.066 2	9.009 2	8.965 -3	8.932 -11	8.91	8.90	8.89
0.025 mol/kg Carbonato monobásico + 0.025 mol/kg Carbonato dibásico.	10.273 54	10.212 33	10.154 25	10.098 20	10.045 17	9.995 17	9.948 18	9.889 14	9.866 23	9.800 28	9.753	9.728	9.725	9.75	9.77
Hidróxido de Calcio (Std. a 20°C).	13.360	13.159	12.965	12.780	12.602 38	12.431 38	12.267 43	12.049 1	11.959	11.678	11.423	11.192	10.984	10.80	10.71

* Covington et al. 1985.

primaria que constituyen la escala internacional del pH. Estas soluciones cubren desde pH= 3.557 como valor más ácido, hasta el más alcalino de 10.012 a 25°C. La respuesta R(pH) del electrodo se define (Bates, 1973 Cap.11) por

$$R(\text{pH}) = (E_2 - E_1) / (\text{pH}_2 - \text{pH}_1) \quad (18)$$

que se obtiene experimentalmente leyendo el voltaje E_1 y E_2 de dos soluciones cuyos respectivos pH_1 y pH_2 son conocidos. La respuesta ideal del electrodo de vidrio, al leer dos soluciones con un potencial de unión líquida constante, es la misma que la del electrodo de hidrógeno; es decir que debe satisfacerse

$$E_2 - E_1 = (RT \ln 10 / F) (\text{pH}_2 - \text{pH}_1) \quad (19)$$

de donde

$$(RT \ln 10) / F = mte\delta = (E_2' - E_1') / (\text{pH}_2 - \text{pH}_1) \quad (20)$$

que define el valor teórico de la pendiente ($mte\delta$). E_1' y E_2' denotan las fuerzas electromotrices respectivas de las soluciones 1 y 2, determinadas con el electrodo de hidrógeno.

Estos valores a diferentes temperaturas se muestran en la Tabla IV-4.

TABLA IV-4.
PENDIENTE DE NERNST A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Temperatura (°C)	Pendiente (mV/pH)
0	-54.20
20	-58.07
25	-59.06
30	-60.05
50	-64.01

El valor experimental de la pendiente puede diferir del teórico, por lo que se define la relación entre las pendientes como la "eficiencia electromotriz" β (Bates, 1973).

$$\beta = m / mte\delta = (E_2 - E_1) / (E_2' - E_1') \quad (21)$$

Una pendiente mayor al 95% se considera adecuada (Wescott, 1978). Para su uso posterior se presentan, en la Tabla IV-4, los valores de pH de los estándares más utilizados en este trabajo, en función de la temperatura.

TABLA IV-5.
pH DE ESTÁNDARES EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.

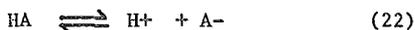
Temperatura (°C)	Estándares de pH			
	4*	7*	10*	10**
0	4.000	7.12		10.317
10	3.997	7.06	10.15	10.179
20	4.001	7.02		10.062
25	4.005	7.00	10.00	10.012
30	4.011	6.99	9.96	9.966
40	4.027	6.97	9.87	9.889

* Estándares Sigma

** Estándar elaborado en el laboratorio. Staples et al. (1969)

IV.5. pH de una solución amortiguada en función de la fuerza iónica.

La definición del pH está dada en términos de la actividad de protones. En el caso de una solución amortiguada el equilibrio del amortiguador es el factor determinante del pH. Considérese la disociación esquemática de un amortiguador



en el equilibrio

$$K = \frac{(H^+)(A^-)}{(HA)} \quad (23)$$

donde: (HA) Actividad de la fracción no disociada.

(A-) Actividad de la fracción disociada.

De esta relación obtenemos

$$pK = -\log K = -\log(H^+) - \log \frac{(A^-)}{(HA)} \quad (24)$$

y despejando

$$pH = pK + \log \frac{(A^-)}{(HA)} \quad (25)$$

que es la llamada ecuación de Henderson-Hasselbach. Esta ecuación puede descomponerse en

$$pH = pK + \log \frac{C(A^-)}{C(HA)} + \log \frac{A^-}{HA} \quad (26)$$

los términos de concentración y de coeficientes de actividad. Se observa así que el pH de una solución amortiguada es función del

cociente de coeficientes de actividades del amortiguador utilizado. Dicho cociente suele denominarse pK' .

El tratamiento más utilizado para determinar la contribución de la fuerza iónica en los coeficientes de distintos amortiguadores es la ecuación de Davies (Davies, 1962) que proviene de una adecuación experimental del tratamiento de Debye-Hückel. La ecuación de Davies se expresa por

$$\log = z^2 \left(- \frac{A I^{\frac{1}{2}}}{1+I^{\frac{1}{2}}} + 0.15 I \right) \quad (27)$$

Donde: A es una constante que depende de la temperatura y de la constante dieléctrica del medio ($A=0.51$ a 25°C), z la valencia del amortiguador, I la fuerza iónica definida por

$$I = 1/2 \sum C_i z_i^2 \quad (28)$$

Con dicha ecuación se obtuvo la Tabla IV-6, que expresan las correcciones relativas a $I=70$ mM, para amortiguadores monovalentes ácidos o zwitteriónicos, en cuyo caso el factor se resta y para básicos se suma, los cuales se utilizarán posteriormente.

TABLA IV-6.
CORRECCIONES DE ACTIVIDAD EN FUNCION DE LA FUERZA IONICA.

I (mM)	pK	I (mM)	pK
1	0.082	70	0.0
2	0.053	100	-0.011
20	0.037	160	-0.026
40	0.018		

$T=30^\circ\text{C}$. I: Fuerza iónica. Para amortiguadores no monovalentes ver (Perrin, 1974 Tabla 2.3) o (Ramette 1983 Tabla 4.4).

En conclusión tomando en consideración las limitaciones aquí mencionadas, así como las restricciones del potencial de unión líquida en soluciones heteroiónicas, para hacer una correcta interpretación del pH obtenido de la lectura en celdas con unión líquida, en soluciones heteroiónicas de interés bioquímico, hacen falta dos requisitos:

- i) Evaluar el coeficiente de actividad del protón en soluciones con varios electrolitos.
- ii) Determinar el potencial de unión líquida de la celda con que se trabaje.

P A R T E B: R E S U L T A D O S.

V. METODOLOGIA.

En la introducción de la tesis se presentaron los temas de cada capítulo. Hemos ya revisado los conceptos fundamentales de fisicoquímica necesarios para la comprensión de la determinación del pH.

Los resultados experimentales que se presentan en esta sección, muestran dificultades en la lectura del pH que son consecuencias de las alteraciones del potencial de unión líquida residual entre las lecturas del estándar y las distintas muestras que se estudiaron.

Es importante dejar claro que buena parte de los resultados no son determinaciones directas del potencial de unión líquida. Los resultados son lecturas potenciométricas del pH como lo puede determinar cualquier bioquímico en el laboratorio. Unicamente en el capítulo IX se muestran determinaciones del potencial de unión líquida, las cuales se comparan con la lectura del pH correspondiente.

Las soluciones que se utilizaron fueron las siguientes:

- i) Estándares Sigma de pH 4,7 y 10. Ver Caps. IV y VI.
- ii) Estándares que se prepararon en el laboratorio, pH 2.6 y 10. Ver Caps. IV y VI.
- iii) Una solución de ácido clorhídrico 4.3 mM. Ver Cap. VIII.
- iv) Soluciones HEPES y Tris 1.6 y 5 mM, pH=7.4 a 30°C ajustado con NaOH o HCl respectivamente. Ver Caps. VII al XI.
- v) Una solución Ringer poco amortiguada ajustada con NaOH a pH=7.40 a 30°C, con la cual se registró el eflujo ácido de los sinaptosomas (Ver Cap. XI),cuya composición es:

Sustancia	Concentración (mM).
HEPES*	1.6
NaCl	145
KCl	5
MgCl ₂	1.2
CaCl ₂	0.02
Glucosa	10

* Acido sulfónico -N-2-hidroximetilpiperazina N'-2,etano. (Good, 1966).

Esta es una solución con concentraciones iónicas similares a los medios extracelulares con alto sodio y bajo potasio. La fuerza iónica es de 160 mM. Se escogió una baja concentración (1.6 mM) de amortiguador, debido a que nos permite detectar variaciones por cambios en el potencial de unión líquida residual al no contribuir significativamente en la fuerza iónica, puesto que no es de esperar que éstos sean muy grandes (Bates, 1973). La baja capacidad amortiguadora le confiere suficiente sensibilidad al registro del eflujo ácido de sinaptosomas, ver Cap. XI. Por otro lado una concentración más baja de amortiguador hubiera permitido modificaciones en el pH por cambios en el CO₂ del medio ambiente.

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron fundamentalmente tres electrodos de combinación Sigma, dos modelo E-4878 y uno E-5003. Esporádicamente se utilizaron ó uno o dos electrodos Beckman. El electrodo de vidrio, modelo 11263 y el de referencia modelo C-39170, el cual tiene una unión líquida de fibra de cuarzo de mayor superficie de contacto con las soluciones que el sello de cerámica de los electrodos Sigma.

Contamos asimismo con un registrador Honeywell, Electronik 196 con registro de sensibilidad y velocidad variable, de hasta 2.5 cm/0.01 unidades de pH y 2.5cm/seg. acoplado al pHmetro. Este registro se utilizó sobretodo en la evaluación de la eliminación ácida de sinaptosomas, resultados del Cap. XI.

Se utilizaron cuatro pHmetros diferentes, si bien los dos primeros fueron los más utilizados: Un pHmetro Corning modelo 101 y un Orion modelo 701A, ambos con lectura de tres cifras decimales; dos pHmetros Beckman con lectura uno hasta centésimas y el otro hasta milésimas, modelos 3560 y 4500 respectivamente. Los cuatro pHmetros utilizados son de una muy alta impedancia de entrada.

Los denominamos pHmetros y no potenciómetros, ya que no utilizan el principio potenciométrico de un puente Wheatstone para medir la fuerza electromotriz con una resistencia infinita de entrada.

A continuación se describen las distintas rutinas metodológicas utilizadas.

1. Determinación de la pendiente del electrodo de vidrio.(Ver Cap.VI).

La pendiente se determinó de la siguiente forma: Se ajusta el electrodo al valor del estándar primario de pH^1 considerando la temperatura de la lectura, usualmente el estándar 7. Se registran los mV_1 de lectura. Se ajusta enseguida la pendiente al valor del pH_2 del estándar y se determinan los mV_2 leídos. La pendiente se calcula según

$$m = (\text{mV}_2 - \text{mV}_1)/(\text{pH}_2 - \text{pH}_1) \quad (1)$$

El valor porcentual $m\%$ se determina haciendo uso de los valores de pendiente nernstiana teórica (100%), Tabla IV-4, a la temperatura correspondiente.

2. Resistencia a través de la unión líquida. (Ver Cap. VI).

Se midió la resistencia de dos maneras, con corriente directa con un multímetro, o bien con corriente alterna en un registro de impedancia a alta frecuencia. En el primer caso se procede de la siguiente manera: Se coloca el electrodo en una solución saturada de cloruro de potasio. Se calibra el voltímetro a resistencia cero, con terminales de alambre de plata, colocando ambas terminales en la solución saturada de cloruro de potasio. Enseguida se lee la resistencia del sello de cerámica colocando una terminal en la solución de KCl en la que se encuentra el electrodo y el otro en la solución interna de KCl introduciéndolo a través del orificio superior del electrodo. (Wescott, 1978).

3) Titulaciones potenciométricas y volumétricas. (Ver Cap.VIII)

Para las titulaciones potenciométricas y volumétricas se utilizó como estándar primario biftalato de potasio, previamente desecado por dos horas a 115°C.

3.a) Titulación Volumétrica.

Las soluciones que se indican a continuación se hicieron con agua desionizada y decarbonatada por ebullición durante 10 minutos. Las titulaciones se realizaron a temperatura ambiente por la adición de una solución NaOH 4.803+/- .10 mM (n=3), preparada a partir de una solución (Sigma) 0.1 M la cual se tituló con una solución estándar de biftalato de potasio 5.131 mM.

La neutralidad de las titulaciones volumétricas (n=10) se determinó por el punto de vire del azul de bromotimol, cuyo pK es de 7.1 (Ramette, 1981). Se titularon repetidas veces 5 ml de ácido.

3.b) Titulaciones Potenciométricas.

Las titulaciones potenciométricas se realizaron registrando el pH con un electrodo de vidrio y el punto de neutralidad se determinó potenciométricamente (Bard A.I., 1980). Se tituló con biftalato de potasio un estándar de NaOH 9.625+/- .26 mM (n=3). Con dicho NaOH se tituló por triplicado 4 ml del ácido. T=25°C.

4. Estabilidad y Reproducibilidad de la lectura. (Ver Cap. VI).

Todas las determinaciones se hicieron en un baño a 30°C. En las secuencias de estabilidad, se dejó el electrodo de 3 a 5 minutos para estabilización de la lectura, ajustando el pH al valor del estándar, o en caso de la solución fisiológica, habiendo ajustado previamente el pH con el estándar 7. Se inicia entonces el t=0 tomando lecturas de pH cada 5 minutos durante media hora.

En las secuencias para ver reproducibilidad, tras 5 minutos de estabilización de la lectura, se toma la lectura inicial ajustando el pH al valor del estándar, o en caso de solución fisiológica, se ajusta previamente con el estándar 7. Se procede a lavar el electrodo exhaustivamente con agua desionizada, se introduce en la solución (t=0) y se toma inmediatamente el registro de pH en función del tiempo cronometrado por 5 minutos. Se repiten 6 lavados sucesivamente con sus respectivos cinco minutos de registro.

5. Curvas de Δ pH vs H⁺ adicionados. (Ver Cap. IX y XII).

Se realizaron determinaciones del pH de una solución HEPES 1.6 mM, fuerza iónica por adición de NaCl de 100 mM, pH=7.4 a 30°C en agitación constante; así como de la solución Ringer, tras adiciones sucesivas del ácido de concentración conocida. A un volumen inicial de 6 ml, se le adicionan en forma sucesiva 40 ul del ácido 4.3 mM. El pH de la solución se determina después de cada adición al equilibrio y los resultados se expresan como Δ pH contra nanomoles de protones adicionados.

6. Obtención y purificación de los sinaptosomas. (Ver Cap. XI).

Los sinaptosomas se obtuvieron del sistema nervioso central de ratas machos, Sprague-Dawley, por la modificación (Krueger et al. 1979) del método descrito por Hajós (1975).

El proceso de obtención de sinaptosomas se realiza a 0°C. Se obtienen por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa 0.32 y 0.8 M. La fracción 0.8 M enriquecida con sinaptosomas, se equilibra lentamente, para bajar la presión osmótica externa, por adición en frío de una solución sin sacarosa, que contiene (mM): NaCl, 145; KCl, 4; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.02; glucosa, 10; HEPES, 5; ajustada con NaOH a pH=7.40 a 0°C (7.12 a 20°C). Se centrifugan a 13 000 RPM y se recuperan en la pastilla, para enseguida dejarlos en incubación en agitación constante a 30°C por media hora en una solución de idéntica composición que el Ringer anterior, excepto HEPES 5mM y a pH=7.40 a 30°C (7.54 a 20°C). incubación durante la cual se restablece la actividad metabólica, el potencial de membrana y las concentraciones iónicas.

7. Eliminación ácida de los sinaptosomas.

Las alícuotas de sinaptosomas se tomaron después de la incubación previa de 30 minutos a 30°C, se centrifugaron dos veces y se resuspendieron en Ringer HEPES 1.6 mM; en la segunda ocasión se resuspendieron rápidamente en 0.5 ml de la solución de registro y se adicionan a los 5.5 ml de registro. La composición del Ringer HEPES 1.6 mM se describe al inicio del capítulo. Las dos centrifugaciones tienen por objeto eliminar el medio ácido (por la media hora de incubación) en que se encuentran los sinaptosomas, para así minimizar la acidificación debida al medio en que se encuentran los sinaptosomas; además de mantener constante en 1.6 mM la concentración de HEPES en la solución de registro.

Para evaluar la eliminación ácida, se determinó el cambio en el pH externo con electrodo de vidrio como respuesta a la adición de una suspensión de sinaptosomas. Como se mencionó previamente, se requiere utilizar una solución poco amortiguada para obtener una alta sensibilidad, pero suficientemente amortiguada para que no sea sensible a cambios por el CO₂ del ambiente.

Se utilizaron 5.5 ml de solución Ringer HEPES 1.6 mM pH = 7.40 a 30°C en agitación constante, a la cual se adicionaron 0.5 ml de sinaptosomas. Las determinaciones se hicieron con un electrodo E-4878 y el potenciómetro Orión, acoplado al registrador Honeywell a una velocidad de 1.27 cm/min. (0.5 pulgadas/min.)

El eflujo se reportó en nanomoles de H⁺/min./mg. de proteína, haciendo uso de la curva estándar Fig. VIII-5 (Ver sección 5 arriba) y la proteína se determinó por el método de Lowry (1951).

Para eliminar los problemas de ruido en el registro, que aparecen al acercarse al sistema y adicionar con la pipeta Gilman los sinaptosomas, se construyó una pequeña cubierta de malla de alambre que cubre el capuchón del electrodo donde se une el electrodo con el alambre de conexión. Con esta pequeña caja de Faraday se eliminaron dichos problemas de ruido electrostático.

VI. PARAMETROS DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS ELECTRODOS.

El presente trabajo se centra en el estudio de la determinación con electrodo de vidrio del pH en soluciones acuosas de fuerzas iónicas no mayores de 160 mM. Con el objeto de darle mayor validez a los resultados obtenidos, es necesario evaluar previamente distintos parámetros que aseguren el funcionamiento adecuado de los electrodos utilizados. En este capítulo se muestran dichas evaluaciones tanto para el electrodo de vidrio como para el de referencia.

En cada gráfica o tabla de resumen de resultados se indicará el electrodo y pHmetro utilizados.

VI.1 Parámetros del electrodo de vidrio.

Se midió la pendiente del electrodo de vidrio, cada vez que se consideraba necesario, haciendo uso de diferentes estándares de pH 2.6, 4, 7 y dos de 10.

Los estándares 7, 4 y uno de 10 eran soluciones comerciales Sigma, mientras que los estándares de pH 2.6 y el otro de 10, se elaboraron en el laboratorio. El estándar pH= 2.6 se preparó por la mezcla de 89.1 ml de una solución de ácido cítrico Baker 0.1M más 10.9 ml de una solución 0.2M de bifosfato de sodio, Merck (Mc Ilvaine, 1921). Para la elaboración del estándar pH 10, se desecó previamente el carbonato de sodio (Baker) a 275°C por dos horas con el objeto de convertir trazas de bicarbonato en carbonato. Se utilizó carbonato de sodio Merck y agua desionizada que fue decarbonatada por ebullición durante 15 minutos. Para uso posterior se guardó en un desecador con cloruro de calcio.

En la Tabla VI-1 se muestran las composiciones y la fuerza iónica de los cinco estándares. Si se compara con la tabla de estándares primarios reconocidos en la escala internacional de pH, Tabla IV-2 y 3, se observa que de los cinco estándares utilizados, únicamente el estándar 10 que preparamos en el laboratorio y el estándar 4 son estándares operacionales.

Para la evaluación de la fuerza iónica del estándar 7 se utilizaron valores de pK del ácido fosfórico a 25°C de 2.12, 7.21 y 12.31; para el de pH 4, el pK' del ftalato ácido de potasio de 5.27; para el del ácido cítrico se utilizó la primera constante de disociación, pK'=3.13 y para el estándar básico del ácido bórico se utilizó pK' = 9.24. (Dawson et al. 1969).

Se realizaron lecturas de una solución de ácido clorhídrico, Baker, de concentración 4.3 mM, la cual se determinó por titulación potenciométrica y colorimétrica así como por lectura de pH, ver capítulos VIII y VI; previo ajuste con diferentes estándares. Los resultados ilustran el error en la lectura por el ajuste del pH en valores muy alejados del de la muestra; es decir errores en la pendiente utilizada. Como puede observarse en la Tabla VI-2, el valor correcto del pH de la solución ácida, se obtiene al ajustar el electrodo con el estándar pH 2.6.

Tabla VI-1.
ESTANDARES DE pH UTILIZADOS

pH	Composición	Fuerza iónica (mM)
2.6	0.0891 M ácido cítrico (1) 0.0218 M bifosfato de sodio	56.1 *
4	0.050 M ftalato ácido de potasio	25
7	0.040 M fosfato monobásico de potasio 0.026 M fosfato dibásico de sodio	70
10	0.025 M Carbonato de sodio (2) 0.025 M Bicarbonato de sodio	100
10	0.035 M ácido bórico (Sigma)** 0.049 M cloruro de potasio 0.040 M hidróxido de sodio	105 *

T= 25°C. (1) Mc Ilvaine, (1921). (2) Delory, King (1945) y Staples y Bates (1969). * Elaborados en el laboratorio según se indica texto arriba.** La exactitud de la fuerza iónica de este estándar es dudosa, debido a la tendencia a polimerizar del ácido bórico (Staples y Bates 1969).

TABLA VI-2.
LECTURA POTENCIOMETRICA DEL ACIDO PREVIO AJUSTE
CON DIFERENTES ESTANDARES.

Estándares m(%) n de ajuste	pH +/-D.S.	aH+(mM)	(HCl) (mM)
7,4 96 7	2.319+/-0.010	4.80+/-0.11	5.17+/-0.12
4, 2.6 100 3	2.391+/-0.004	4.06+/-0.04	4.38+/-0.04
2.6 - 9	2.401+/-0.006	3.97+/-0.06	4.27+/-0.02

T = 25°C. Electrodo E-4878. pHmetro Corning. Las lecturas se hicieron en agitación constante dejando 2 minutos para un valor estable. La concentración se evaluó utilizando 0.929 como coeficiente de actividad del HCl 5 mM. (Robinson y Stokes, 1970). Para discusión del coeficiente de actividad, ver capítulo IV.

1.b) Respuesta a los 10 segundos.

Otro criterio del funcionamiento adecuado del electrodo de vidrio es el siguiente: Se estandariza el electrodo a pH 10; se sumerge enseguida el electrodo de referencia en el estándar 4 dejándolo por 5 minutos a que alcance el equilibrio. Enseguida se saca el electrodo de vidrio del estándar 10, se lava y se introduce en el estándar 4. Se determina la cinética de respuesta. La lectura a los 10 segundos debe ser 98% o más, de la lectura final (Wescott, 1978). Los resultados se muestran en la Tabla VI-3.

TABLA VI-3.
 RESPUESTA DEL ELECTRODO DE VIDRIO DEL ESTANDAR 10 al de 4
 EN 10 seg.

n	pH
1	4.05
2	4.05
3	4.06
Promedio:	4.053 +/- .006 = 98.9% del valor de la lectura correcta.

T= 25°C. m= 95.7% . n: Número de determinaciones.
 Electrodo de vidrio Sigma E-5003; Electrodo de referencia Beckman.
 pHmetro Beckman 3560.

VI.2 PARAMETROS DEL ELECTRODO DE REFERENCIA.

2.a) Diferencia de potencial entre dos electrodos de calomel.

En el curso de la determinación experimental del potencial de unión líquida del sello de cerámica del electrodo de referencia, se utilizaron dos electrodos de referencia. Uno de ellos es el electrodo de referencia que forma parte del electrodo de combinación Sigma E-4878, el cual se encuentra en una solución de KCl saturado. El otro electrodo fue asimismo un electrodo de calomel, sin unión líquida, ya que se utilizó la referencia de un electrodo de combinación E-5003 roto.

Se midió la diferencia de potencial en una solución con cloruro de potasio saturado, de forma que no hay contribución del potencial de unión líquida, entre cada uno de estos dos electrodos, por un lado y un tercer electrodo de calomel Tacussel con unión líquida y del que se tenían evidencias previas de su buen funcionamiento en el laboratorio. La diferencia de potencial obtenida, con cualquiera de los electrodos, en más de tres ocasiones para cada uno, no sobrepasó el valor de 2 mV. Esto indica un valor de potencial de los electrodos de calomel, cercano a los 242 mV respecto al SHE. Los resultados se muestran en la Tabla VI-4.

TABLA VI-4.
 POTENCIAL ENTRE DOS ELECTRODOS DE CALOMEL.

Electrodo de trabajo	Electrodo de referencia	n	V +/- D.S. (mV)
E-4878	Tacussel	6	-1.42 +/- 1.11
E-4878	E-5003	15	0.37 +/- 0.65

T= 25°C. n: número de determinaciones.

Estas determinaciones se hicieron después de lavar el electrodo E-4878 y rellenarlo con KCl saturado sin plata, ya que por error

se había mantenido el volumen a nivel, con una solución saturada de KCl con cloruro de plata. Tal parece que el efecto que pueda tener la plata, en el electrodo de calomel, es mínimo.

2.b) Curvas Intensidad- Potencial.

Con el objeto de ver la no polarizabilidad de los electrodos de calomel, se realizaron curvas de registro de voltaje a diferentes corrientes aplicadas. En cada determinación se utilizaron tres electrodos en una solución de KCl saturado; el electrodo de trabajo (disco) era el electrodo de referencia en estudio; como referencia se utilizó el calomel Tacussel y como electrodo auxiliar un electrodo de platino. Las lecturas se realizaron con corrientes positiva y negativa alternadamente hasta $\pm 40 \mu\text{A}$, dejando un minuto para de estabilización, Figura VI-1. La linealidad de la curva $i-v$ indica la no polarizabilidad de los electrodos de referencia.

VI.3. PARAMETROS DE LA UNION LIQUIDA.

El estudio del comportamiento de la unión líquida es parte medular de la tesis. Los fundamentos al respecto se encuentran en el capítulo II y los resultados en el capítulo IX. Es por esto que en esta sección se mencionará, como criterio de la unión líquida, únicamente las determinaciones de la resistencia a través del sello de cerámica.

La primera vez se realizó la lectura de la resistencia, (ver Cap.V sección 2) con corriente continua, de un electrodo Sigma E-4878 obteniendo un valor de $250 \text{ K}\Omega$. Se procedió a lavar el electrodo, quitando los cristales depositados al interior del electrodo y cambiando la solución saturada de cloruro de potasio con plata por otra nueva. Después de dejarlo por 12 horas en KCl 0.1M, se obtuvo una resistencia de $10 \text{ K}\Omega$. Se procedió posteriormente de manera sistemática a verificar que la resistencia del electrodo no excediera los $20 \text{ K}\Omega$.

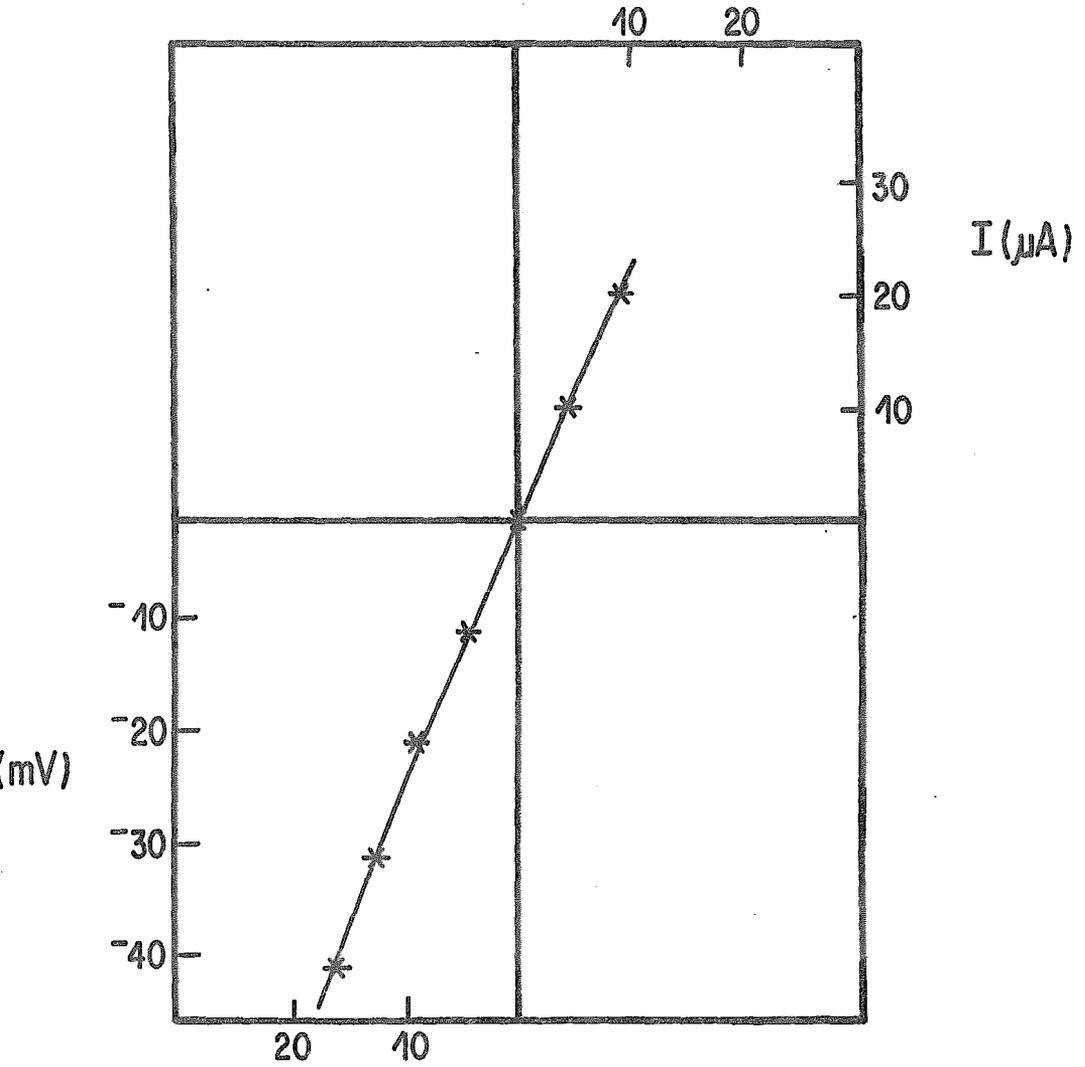
Se observó cierta dependencia entre la resistencia así medida y la magnitud del incremento del pH al pasar de 1 mM a 160 mM en la solución HEPES 1.6 mM, $\text{pH}=7.4$, ver Cap. IX.

En la fase final experimental se realizaron nuevamente determinaciones de la resistencia, haciendo uso esta vez de corriente alterna en un registro de impedancia a alta frecuencia. Se determinó una resistencia de $2.6 \text{ K}\Omega$, Figura VI-2.

Como ya mencionamos previamente, buena parte del trabajo realizado, se acompañó de la determinación de la resistencia utilizando un multímetro. Las resistencias obtenidas en las lecturas periódicas oscilan entre 12 y $3 \text{ K}\Omega$. Durante el desarrollo de esta parte del trabajo, se rellenaba por error al electrodo de referencia utilizando una solución saturada de KCl que contiene plata. Previo a la última ocasión en que se lavó el electrodo E-4878 se midió la resistencia con multímetro obteniendo $16 \text{ K}\Omega$ y medida con corriente alterna se obtuvo $2.6 \text{ K}\Omega$. Después de lavarse y rellenarse con KCl sin plata, la resistencia con corriente alterna fue de $2.6 \text{ K}\Omega$, pero ya no fue posible, ni con alambres de

FIG. VI-1

Curva i-v del Electrodo de Calomel



$Im(Z)$ k. Ω /cm²

-0.4

-0.3

-0.2

-0.1

0.0

0.1

0.2

2.7

2.8

2.9

3.0

3.1

3.2

3.3

$R(Z)$ k. Ω /cm²

DONNEES INITIALES

20
Bloc de mesure no : 2
Execi no : 1
Date : 18 JUN 88
Operateur : JULIO
Elect. de Travail : CAL
Elect. de refer. : CAL
Elect. Auxiliaire : PT
Condit. Chimiques : KCl SATURADO

MODE DE FONCTIONNEMENT

Potentioestatique
Automatique
Attente de stabilisation
Pas d'attente entre les mesures
Ajustement sur le potentiel libre

CONDITIONS DE MESURE

Freq. 1 (init.) : 5.00e 01 Hz
Intervalle : 5
Nb. Freq./interv. : 1
Freq. finale : 2.00e-02 Hz
Balayage retour : 0

CONDITIONS DE MESURE

dE crête crête : 10.0 mV
Nb. de sinusoides : 1
Nb. de diagrammes : 1

SEUILS

Courant maximum : 5.00e 01 uA
Crit. ajust. I=0 : 1.00e-01 uA
Crit. Stab. I : 5.00e-01 uA/cm
temporisation : 3.00e 01 s
Crit. Stab. Elibre : 5.00e-01 mV/cm
temporisation : 3.00e 01 s

FIG. VI-2

Impedancia vs Resistencia a Frecuencias Variables

La abscisa de I = 0 indica la resistencia R = 2.6 K Ω

plata ni de platino, determinar la resistencia con multímetro. Esto indica que en la resistencia determinada con corriente continua participa una resistencia debida a la reacción electro-lítica entre los alambres de lectura y la plata en la solución. Efectivamente se sabe que las primeras determinaciones de la conductancia de soluciones electrolíticas indicaban una resistencia variable dependiendo del voltaje aplicado, debido a la polarización de los electrodos por el uso de corriente directa (Vojtech et al. 1977 Cap.24).

Si bien el valor absoluto de la resistencia determinada con un multímetro no es correcta, las determinaciones obtenidas fueron bastante reproducibles, por lo que consideramos que pueden ser útiles como criterio relativo del taponamiento de la unión líquida por exceso de cristales o bien por proteína o fragmentos de membrana adherida.

VI.4 PARAMETROS DEL SISTEMA COMPLETO DE REGISTRO.

4.a. Tiempo de respuesta.

Se determinó el tiempo de respuesta a la adición de 100 μ l de ácido 4.3 mM en 6 ml de solución Ringer HEPES 1.6 mM, a 25°C y pH inicial =7.4. Se utilizó el registrador Honeywell acoplado al pHmetro Corning, en velocidad máxima de registro de 2.5 cm/seg. Una vez iniciado el registro estable, se adicionaron los 100 μ l de ácido con la punta de la pipeta Gilman sumergida en la solución y simultáneamente se marcó en el papel de registro el inicio de la adición.

TABLA VI-5.
TIEMPO DE RESPUESTA A LA ADICION ACIDA.

	n	Tiempo (segundos)
Tiempo de respuesta a la adición de 100 μ l HCl 4.3 mM	4	0.16 +/- .02

T=25°C. Electrodo E-4878. pHmetro Corning. Volumen inicial:6 ml de solución Ringer, HEPES 1.6 mM. Velocidad máxima de agitación.

4.b. Velocidad de respuesta a la adición ácida.

Como un criterio de utilidad experimental para estudios cinéticos, se determinó la velocidad de respuesta del electrodo de combinación a la adición de diferentes cantidades de ácido. Se realizaron adiciones de 20,40.80 y 120 μ l de ácido clorhídrico 4.3 mM a un volumen inicial de 6 ml de solución Ringer, HEPES 1.6 mM, pH=7.4, a 25°C. Se utilizó el registrador Honeywell acoplado al pHmetro Corning, en velocidad máxima de registro de 2.5cm/seg.

Estas adiciones se realizaron a dos velocidades de agitación diferente, una de las cuales es la velocidad máxima del agitador magnético. Los resultados obtenidos Figuras VI-3 y 4, del promedio de 5 adiciones en cada condición muestran que:

FIG. VI-3

Respuesta a la Adición Acida

Velocidad de agitación máxima

nmoles H^+

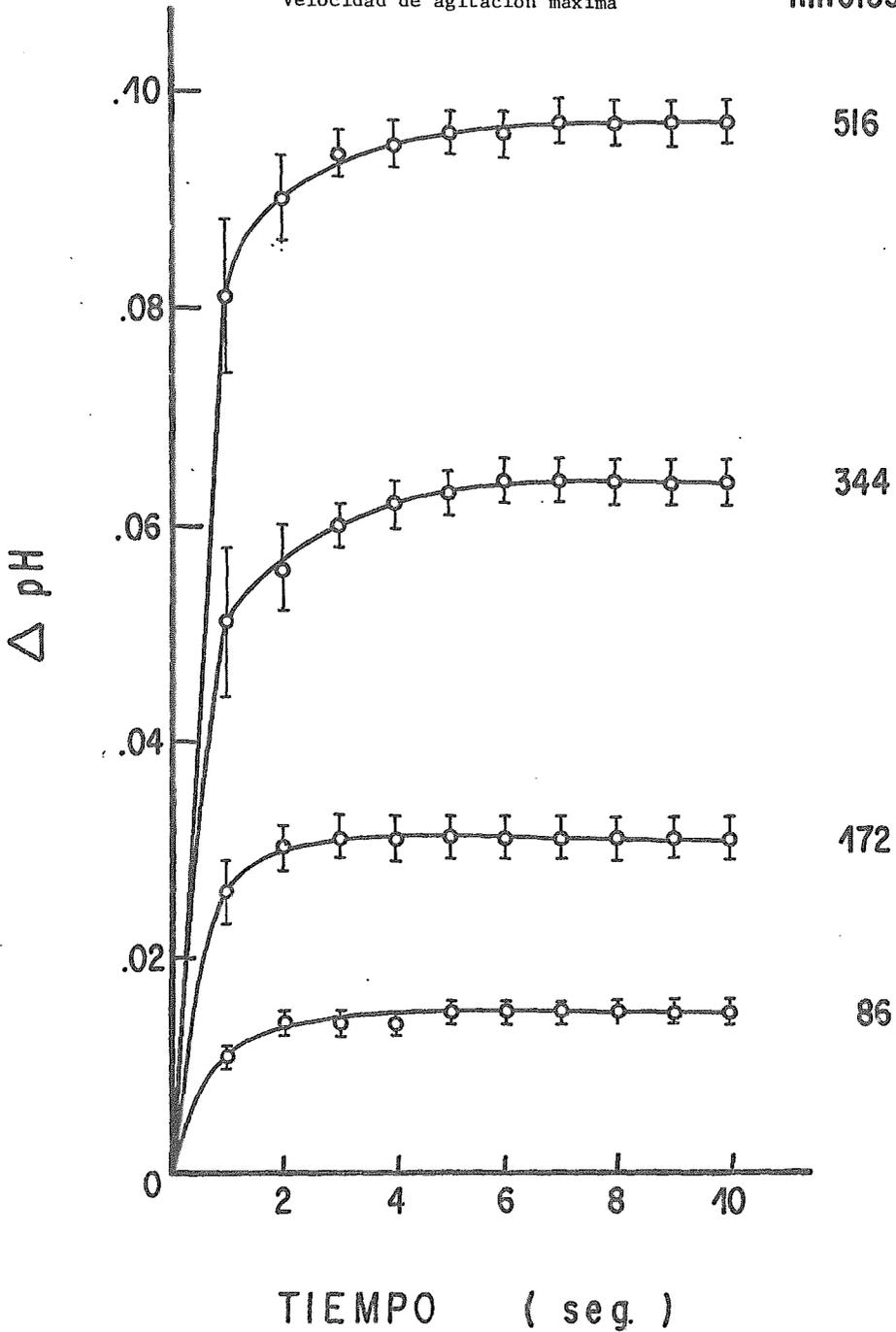
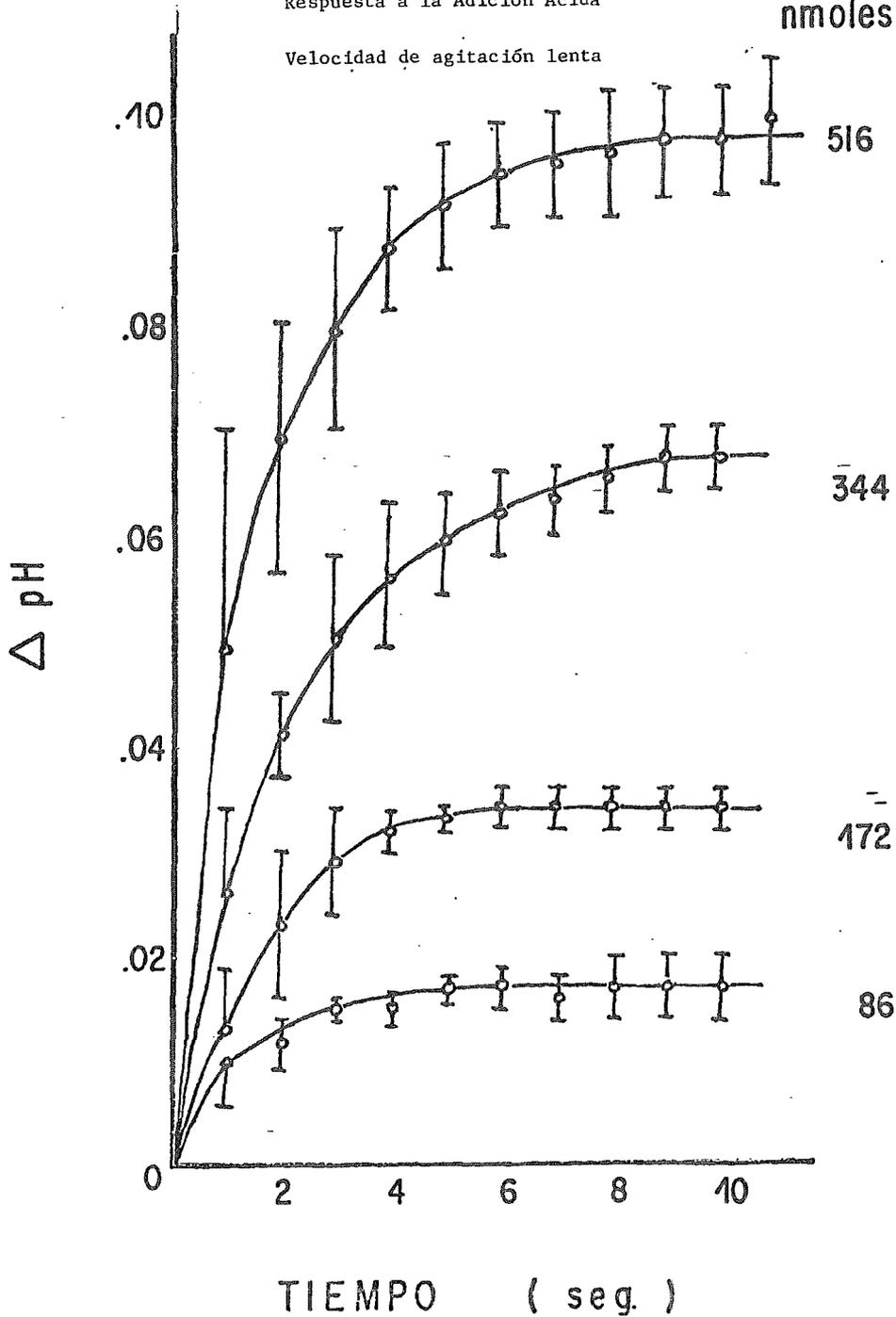


FIG. VI-4

Respuesta a la Adición Acida

Velocidad de agitación lenta

nmoles H^+



La pendiente inicial del cambio en el pH en función del tiempo, depende de la cantidad adicionada. Esta es mayor conforme más ácido se adicionó. El tiempo al equilibrio en condición de agitación lenta y de máxima agitación es prácticamente independiente de la cantidad de ácido; del orden de 6 segundos en velocidad lenta y de 3 segundos en velocidad máxima. Se obtuvo el cambio en concentración en función del tiempo, Fig. VI-5a, así como la pendiente dH^+/dt proporcional a la corriente. Se realizaron las transformaciones que se muestran en la Fig. VI-5 b y c, en donde el registro logarítmico se hizo pensando que la respuesta del electrodo podría atribuirse al comportamiento capacitivo (Geddes, 1972), mientras que una relación lineal de la corriente respecto a $1/t^{1/2}$ indicaría que la limitante es el componente difusivo próximo al electrodo de vidrio. Si bien en ninguno de los dos casos se obtiene claramente una recta, la respuesta del electrodo se aproxima más a la cinética de descarga de un componente capacitivo, que a una limitación difusional.

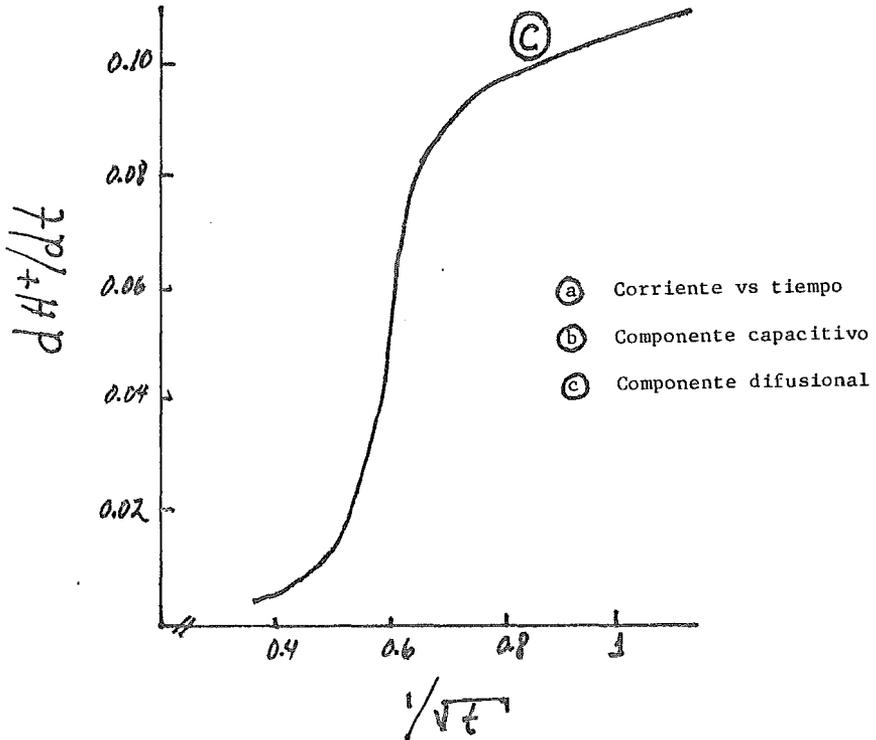
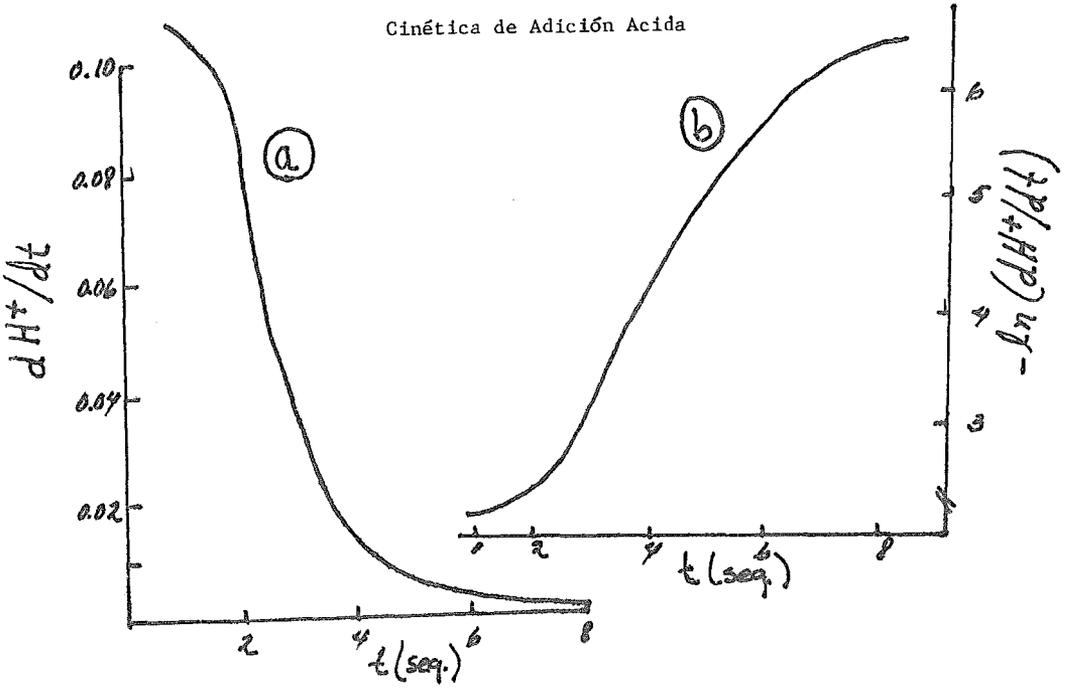
En resumen los resultados de cada uno de los electrodos así como del sistema completo pueden resumirse en la siguiente tabla.

TABLA VI-6.

RESUMEN DE PARAMETROS DE LOS ELECTRODOS.

ELECTRODO	PARAMETRO	CRITERIO O RESULTADO.
De vidrio	pendiente	>95%
Calomel	Curva i-v	lineal
Calomel	Potencial entre dos electrodos	+/- 1mV
Sistema completo.	Tiempo de respuesta.	0.16 seg.
Sistema completo.	Velocidad de respuesta a la adición ácida en agitación máxima.	Equilibrio en 3 segundos.

FIG. VI-5.
Cinética de Adición Ácida



VII. ESTABILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LA LECTURA DE pH.

La escala internacional del pH (Covington et al. 1985), señala valores de estándares (Ver capítulo V) con definición hasta la milésima de $\text{pH} \pm 0.003$. Por ejemplo a 25°C la solución estándar de ftalato ácido de potasio tiene un pH de 4.005. Esta precisión en la definición de la escala de pH puede hacernos pensar en la posibilidad de preparar otras soluciones con pH definido también en el orden de la milésima de unidades.

La reproducibilidad (Mattock y Band 1967) o repetibilidad (Kater et al. 1963) de la lectura se define por la repetición de mediciones de una solución única, o bien, de diferentes muestras de una misma solución que se considera constante, utilizando el mismo equipo por el mismo operador.

Se realizaron determinaciones de la estabilidad y de la reproducibilidad de la lectura potenciométrica del pH, en los tres estándares Sigma, así como en la solución Ringer 1.6 mM. En cada solución se realizaron cuatro repeticiones de la determinación de la lectura por media hora y cuatro de una secuencia de media hora de duración, de 5 determinaciones para ver la reproducibilidad de la lectura.

Esto hace un total de 32 secuencias, 8 de cada solución, las cuales se realizaron al azar utilizando una tabla de números aleatorios. El orden de cada tipo de secuencias se muestra en la Tabla VII-1.

TABLA VII-1
DETERMINACION DE ESTABILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.
DISTRIBUCION AL AZAR.

	Std.7	Std.4	Std.10	Ringer
Estabilidad	3,13,21,29	6,14,22,30	7,15,23,31	8,16,24,32
Reproducibilidad	1,9,7,25	2,10,18,26	3,11,19,27	4,12,20,28

Las determinaciones se hicieron con electrodo E-4878 y pHmetro Corning a 30°C, en constante agitación, en un volumen de 15 ml en viales de vidrio. El desarrollo metodológico se describe en el Cap. V, sección 4.

VII-1. Estabilidad.

Los resultados tanto individuales como los valores promedio, se muestran en las Figuras VII-1 a 6. En las curvas de determinaciones individuales se observa una variación en media hora cercana a 0.010 unidades de pH. Los cambios no siguen la misma tendencia, es decir que pueden aumentar o disminuir al azar. La media de los valores de los estándares 7 y 10, suben en media hora 0.002 y 0.006 unidades de pH respectivamente, mientras que con el estándar 4 la media baja 0.010 unidades de pH.

Los resultados con la solución fisiológica mostraron bastante

FIG. VII-1

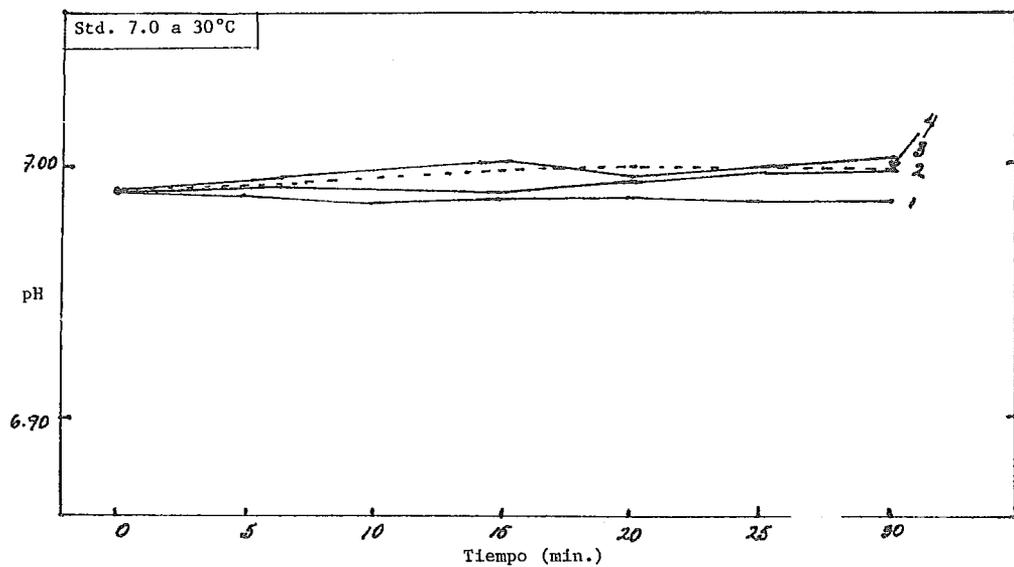


FIG. VII-2

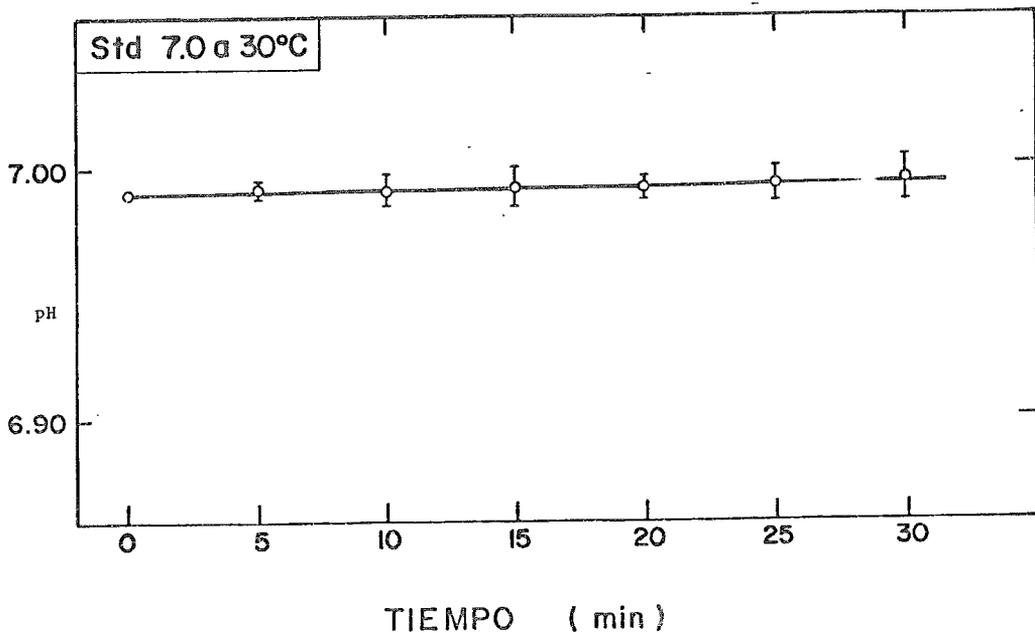


FIG. VII-3

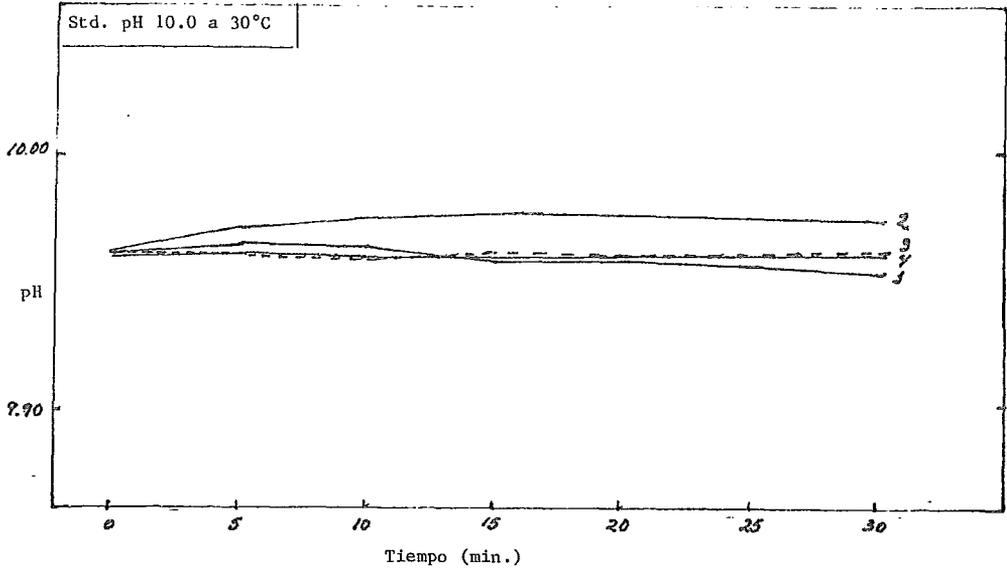


FIG. VII-4

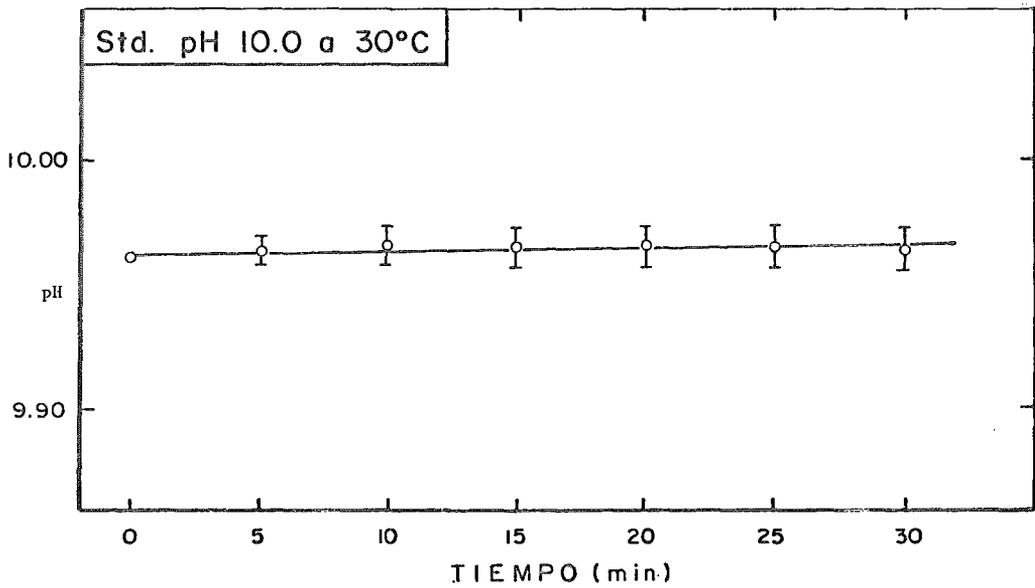


FIG. VII-5

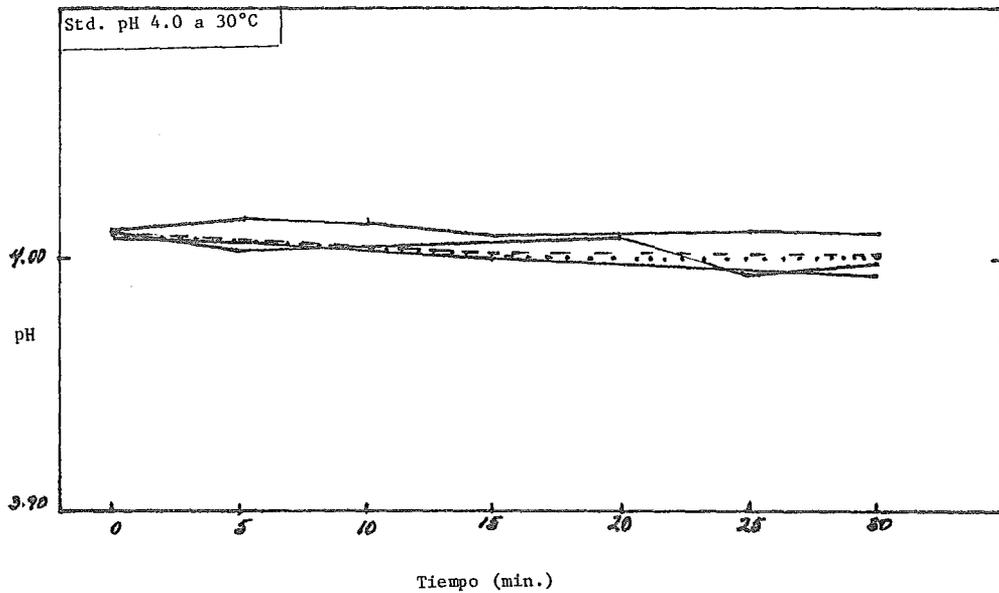
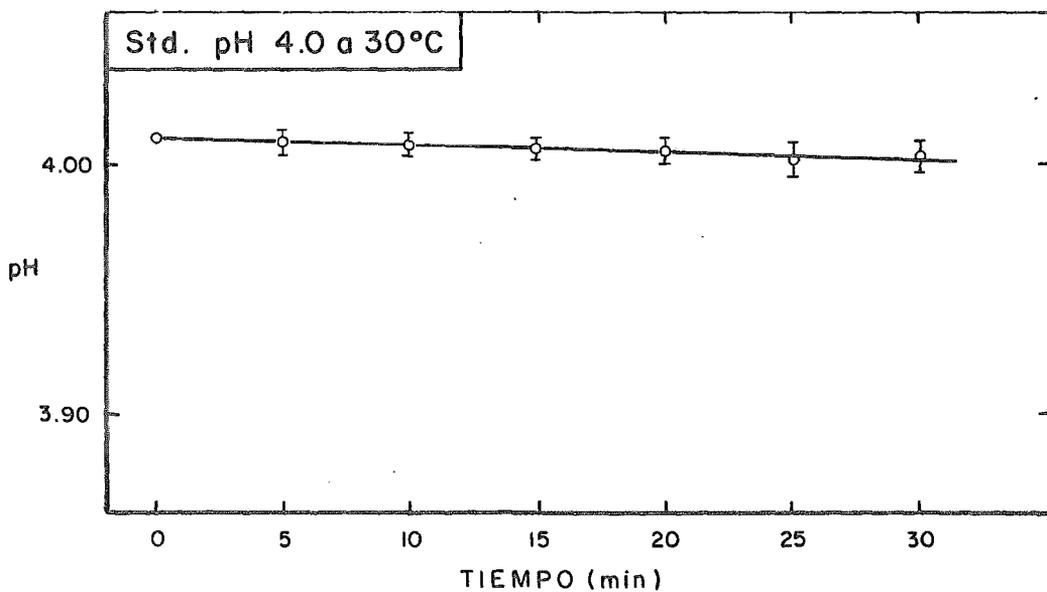


FIG. VII-6



dispersión en las lecturas de días sucesivos al pasar de 7.34 al inicio a 7.25 el día 12. Esto se debe muy probablemente a contaminación de la solución por tantos días que se trabajó, además de haber leído volúmenes pequeños en viales de vidrio, en los que posteriormente encontramos dificultades en la estabilidad de la lectura debido a la liberación y unión inespecífica de iones (Comunicación personal Dr. Ciryll Moore).

Se realizaron dos grupos de determinaciones, nuevamente en la solución Ringer. En el primero de ellos, con electrodo E-4878, se partió de 250 ml de solución, que fue separada en 5 frascos de vidrio Pyrex con 50 ml cada uno. Estos frascos se descongelaron cada uno en días diferentes, se equilibraron a 30°C y enseguida se tomaron 6 ml para el registro de estabilidad. Los valores se muestran en la Figura VII-7. El registro del frasco 4 mostró la menor fluctuación de pH/media hora, mientras que el 5 cayó 0.035 unidades de pH en media hora.

Posteriormente se repitieron estas determinaciones, esta vez con un electrodo Beckman, ya que el electrodo E-5003 que utilizábamos en ese tiempo, tenía un comportamiento muy inestable, probablemente debido a que se había sumergido recientemente en una suspensión de resina de intercambio iónico, (ver capítulo X). Esta vez se utilizó una única solución, que se descongeló repetidas veces durante los 5 días en que se realizaron las determinaciones.

Se ajustó previamente el pH con estándar 7 y 10, el pH inicial de la solución es de 7.400; en caso de tener un pH a los tres minutos diferente de 7.400 +/-0.005, se ajustó el pH por adición de sosa o ácido. De esta forma las 5 determinaciones de estabilidad tienen prácticamente el mismo valor de pH inicial. Los resultados se observan en las Figuras VII-8 y 9. Se obtuvo un incremento o "drifting" de 0.017 +/-0.008 unidades de pH en 1/2 hora. En la Fig. VII-10 se observan los mismos registros en una escala ampliada. Al hacer el análisis del cambio de pH promedio por minuto, se determinó un aumento de 0.001 +/-0.0005 unidades de pH por minuto.

Los valores promedio y las desviaciones estándar de los registros, Figuras VII-7 y 8, no son comparables entre sí, ya que en el primer caso los valores de pH inicial son más dispersos que en el segundo. Sin embargo los registros individuales obtenidos con el electrodo E-4878 muestran menor estabilidad que los obtenidos con el electrodo Beckman. Ambas determinaciones se hicieron con el mismo pHmetro, por lo que la única diferencia es el tipo de electrodos. Una posible explicación a lo obtenido, es sugerir que el electrodo Beckman, con una unión líquida de mayor flujo, produzca una lectura más estable que el electrodo E-4878.

Se realizaron dos determinaciones de estabilidad con duración de una hora, en una de las cuales se burbujeó al inicio CO₂ para bajar el pH cerca de 0.1 unidades y ver la capacidad de recuperación del sistema, ver Figura VII-11. En el curso de una hora en constante agitación, a 30°C el pH se recuperó 0.030 unidades.

En el otro registro, Figura VII-12, el pH disminuyó 0.018 unidades en una hora, tiempo durante el cual el estándar pasó de 6.990 al inicio a 6.957 al final. Después de reajustar el es-

FIG. VII-7

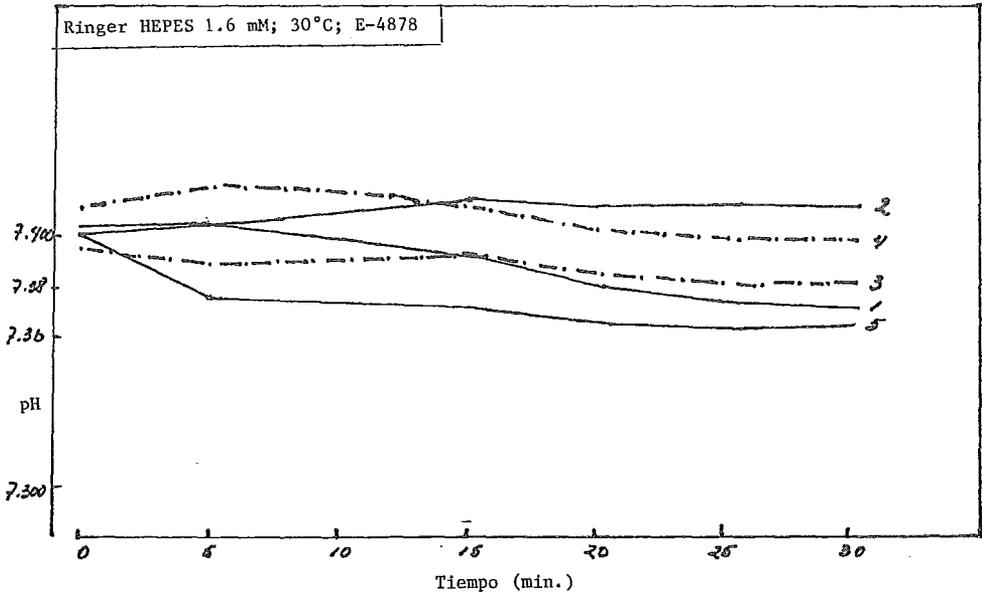


FIG. VII-8

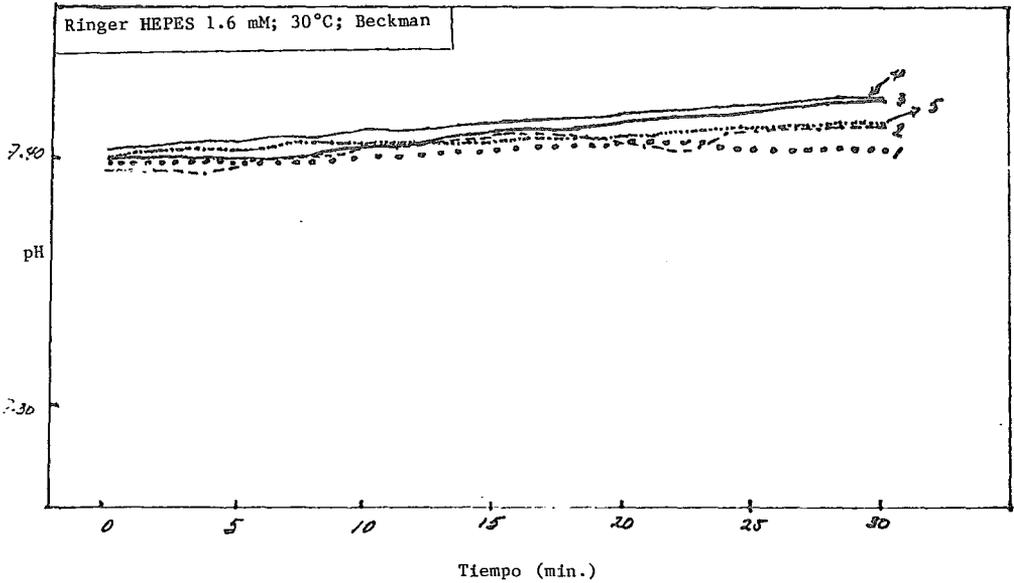


FIG. VII-9

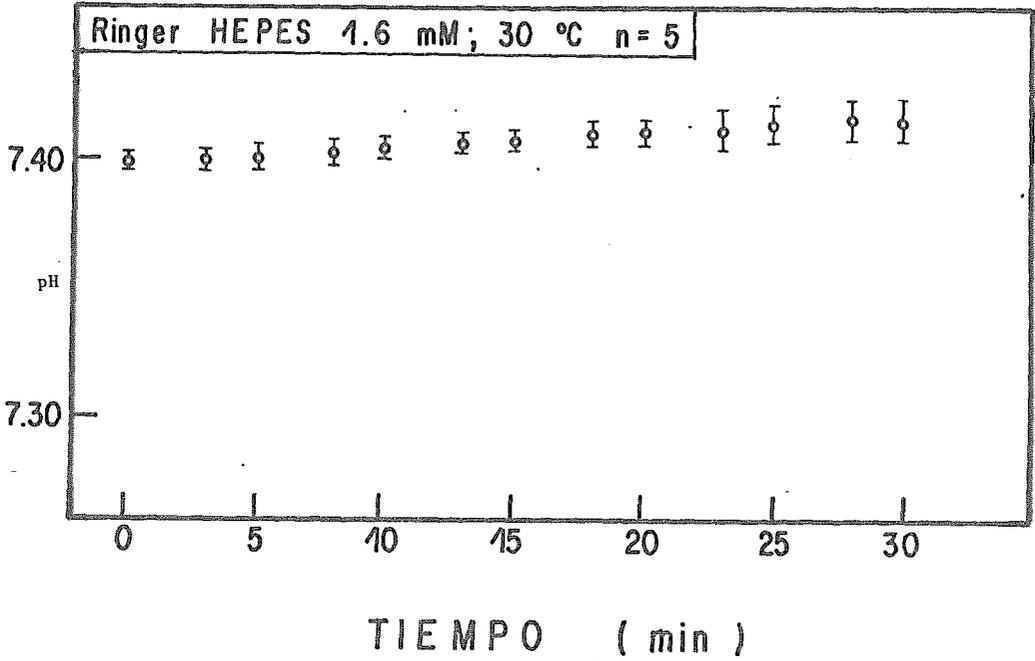


FIG. VII-10

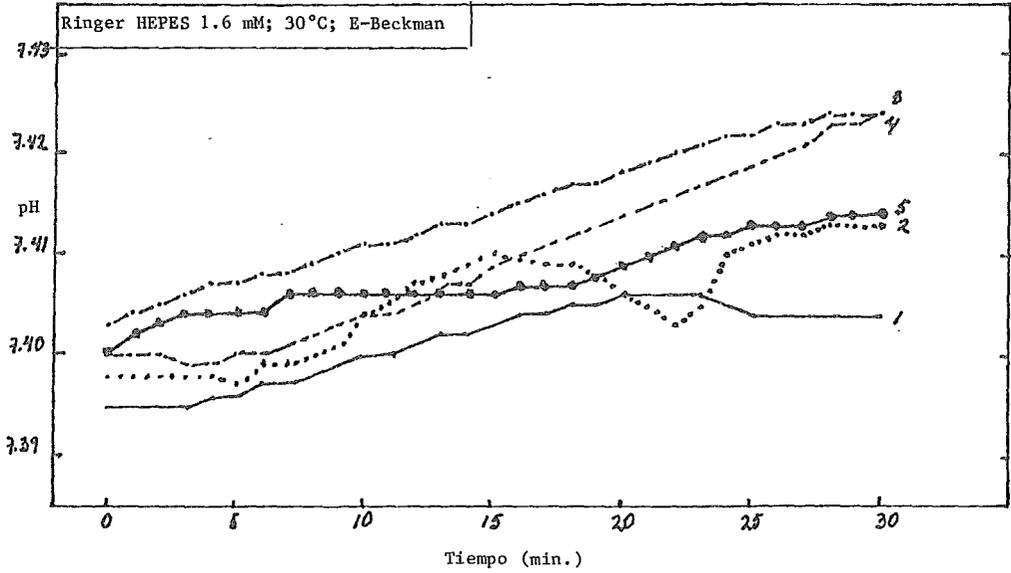


FIG. VII-11

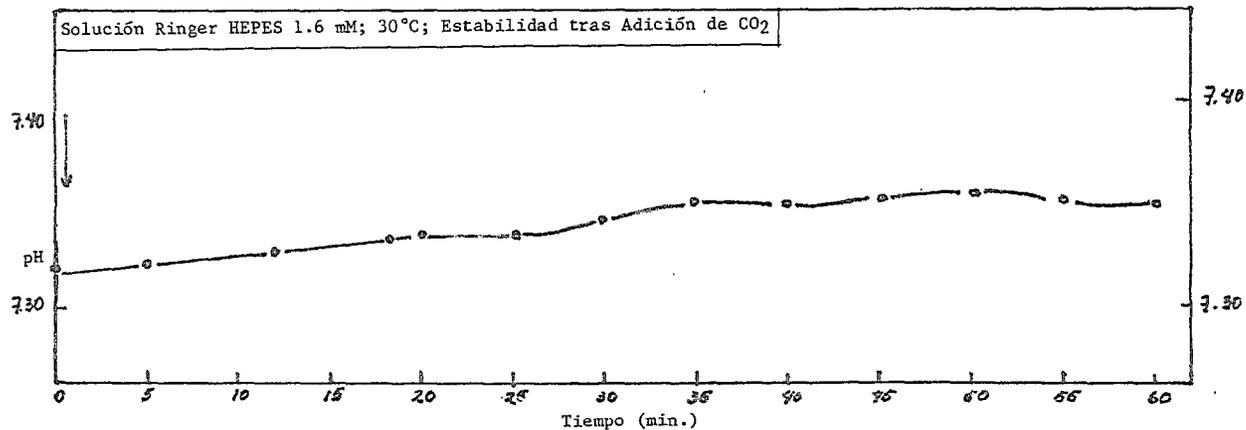
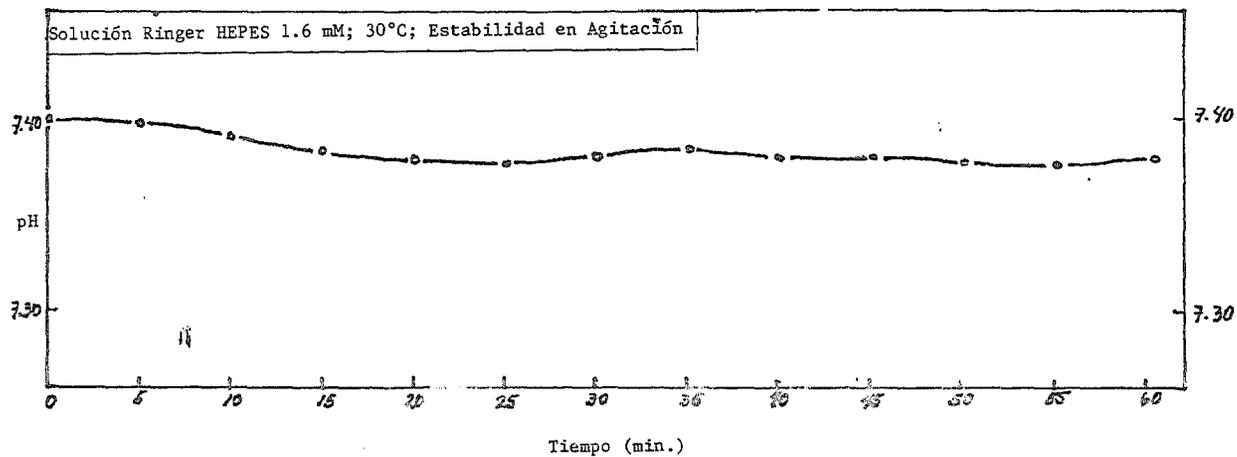


FIG. VII-12



tándar, la solución leyó 7.407 \pm 0.001 (n=3).

El conjunto de resultados de estabilidad en soluciones estándar 4, 7 y 10 y en la solución Ringer, indican en nuestras condiciones de trabajo, un cambio promedio en media hora no mayor a 0.020 unidades de pH. Estos resultados serán de utilidad como controles de los experimentos con sinaptosomas, Cap. XI.

VII.2 Reproducibilidad.

Con el objeto de facilitar la comprensión de los resultados presentados, puede verse la Figura VII-13, donde se muestra que el análisis de los resultados, nos permite estudiar la reproducibilidad en un mismo día, así como la reproducibilidad de la lectura en días sucesivos. Los resultados de estas dos variables a diferentes tiempos de terminado el lavado, se muestran en las Tablas VII-2 y 3 para soluciones estándar de pH y Ringer respectivamente. Así por ejemplo, en la Tabla VII-3, el valor al día 1, tiempo cero, de 7.392 \pm 0.006 es el valor promedio del pH inicial de los 5 lavados que se realizaron el día 1. El valor al lavado 1, tiempo 3 minutos, de 7.395 \pm 0.018 es el promedio del pH de los 5 primeros lavados de cada uno de los 5 días en que se realizaron las secuencias de lavado, promedios tomados a los 3 minutos de terminado el lavado.

En las cuatro repeticiones de los sucesivos cinco lavados de las soluciones estándar, se obtuvo que el valor promedio a diferentes tiempos de lectura, tienen una desviación estándar no mayor a 0.016 unidades de pH, con una media muy cercana al valor de calibración, ver Tabla VII-3. En los tres estándares estudiados se observa que la variación entre el valor promedio del primero al quinto lavado, en días sucesivos en el tiempo t=3 minutos, es menor de 0.010 unidades de pH. No es de esperar diferencias de un día a otro en el valor del pH ya que cada día se calibra el electrodo al valor de pH del estándar. Lo que se observa es que los lavados sucesivos (hasta 5) no alteran la lectura del pH, obteniéndose valores repetibles independientemente de la historia previa de lecturas del electrodo, ya sea lectura de solución Ringer, de estándar 7, 4 o lectura de estándar 10. Es equivalente leer 5 veces una solución estándar de pH en un mismo día, que leerla una vez cada día durante 5 días. Ver (Kater et al., 1963).

Se observa que la cinética de lavado no sigue siempre una curva ascendente o descendente. No hay una única dirección en la respuesta inmediata del electrodo frente a los lavados con agua desionizada, como puede observarse en la dirección temporal de los promedios en un mismo día. Sin embargo la reproducibilidad de la solución Ringer en días sucesivos, muestra un incremento de los valores promedio del t=0 a los 3 min. Las desviaciones estándar disminuyen con el tiempo, pero menos drásticamente que en los promedios de un mismo día. A los 3 minutos la desviación estándar es de cerca de 0.02.

TABLA VII-2
REPRODUCIBILIDAD DE LA LECTURA DE pH

A. EN DIAS SUCESIVOS.

pH +/-D.S.	pH +/-D.S.	pH +/- D.S.
ESTANDAR pH 7.		
Lavado		
No.	t= 1min.	t= 3min.
0	Ajuste de pH	6.991 .001
1	6.989 .010	6.992 .001
2	6.993 .004	6.988 .012
3	6.988 .016	6.992 .009
4	6.984 .014	6.996 .009
5	6.987 .012	6.995 .007
		6.992 0.0
		6.992 .006
		6.988 .013
		6.993 .009
		6.996 .008
		6.998 .005

ESTANDAR pH 4.		
Lavado		
No.	t= 1min.	t= 3min.
0	Ajuste de pH	4.010 0.0
1	4.020 .036	4.003 .005
2	4.003 .040	4.003 .011
3	3.990 .047	3.997 .016
4	3.983 .050	3.988 .011
5	4.001 .051	3.998 .016
		4.010 .001
		4.004 .005
		4.003 .012
		4.000 .013
		3.988 .011
		3.988 .016

ESTANDAR pH 10.		
Lavado		
No.	t= 1min.	t= 3min.
0	Ajuste de pH	9.996 .001
1	9.957 .005	9.966 .008
2	9.969 .015	9.965 .006
3	9.960 0.0	9.963 .011
4	9.954 .024	9.960 .005
5	9.955 .010	9.960 .005
		9.961 .001
		9.966 .008
		9.965 .005
		9.963 .009
		9.961 .004
		9.961 .005

No hay gran diferencia al tiempo t=1 min. en la reproducibilidad de los resultados, tanto en el mismo día como en días sucesivos de cualquiera de los tres estándares y la solución fisiológica.

B. EN UN MISMO DIA

pH +/- D.S.			pH +/- D.S.			pH +/- D.S.		
ESTANDAR pH 7.								
Día	t= 1min.		t= 3min.		t= 3-5min.			
1	-----		6.991	.011	6.990	.013		
2	6.992	.003	7.000	.005	7.003	.002		
3	6.977	.008	6.988	.003	6.990	.006		
4	6.998	0.0	6.990	.003	6.990	.002		

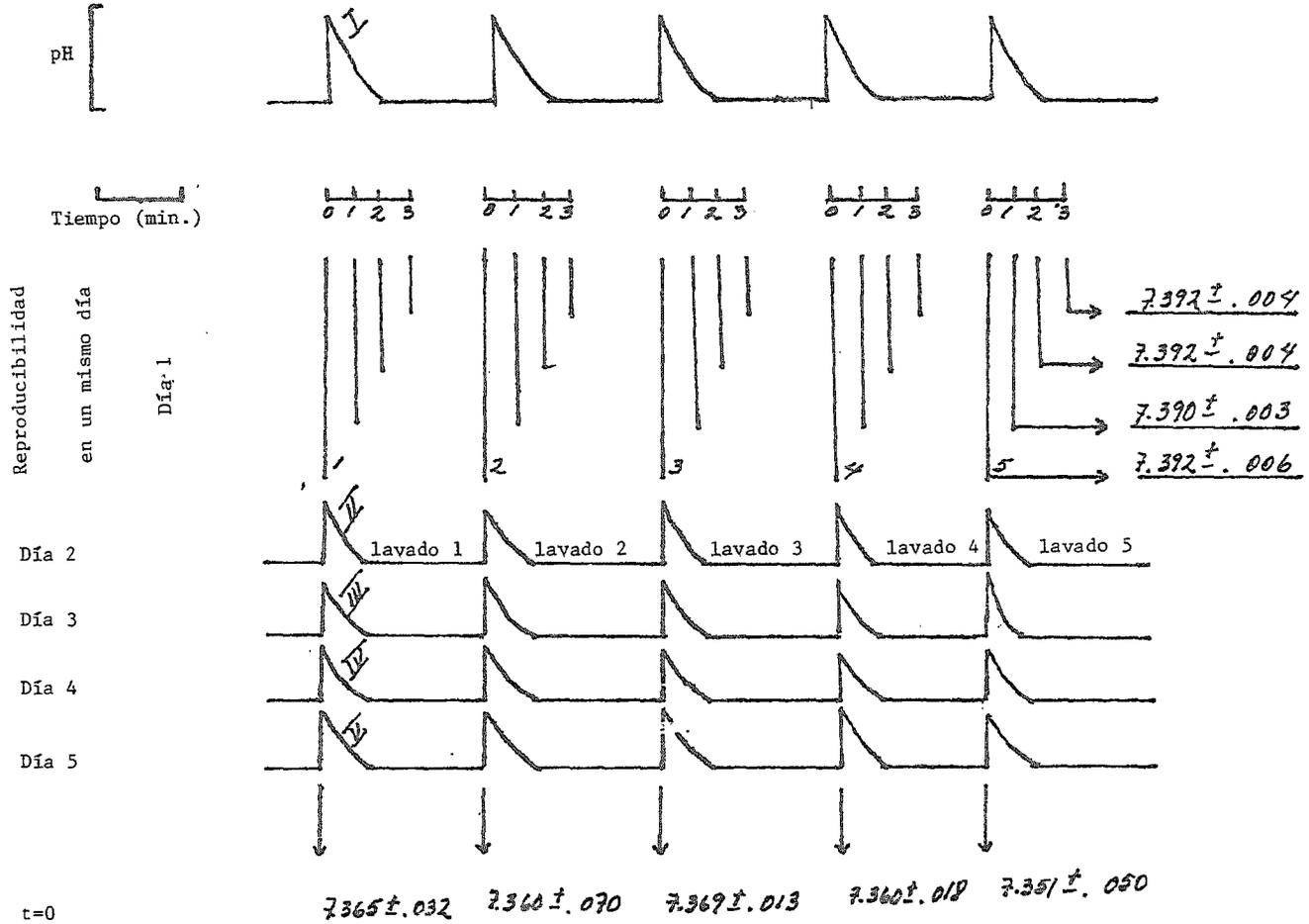
ESTANDAR pH 4.								
Día	t= 1min.		t= 3min.		t= 3-5min.			
1	4.034	.017	3.998	.008	3.996	.007		
2	4.025	.013	4.005	.006	4.005	.006		
3	3.948	.025	3.990	.012	3.986	.008		
4	4.000	.032	4.012	.003	4.013	.003		

ESTANDAR pH 10.								
Día	t= 1min.		t= 3min.		t= 3-5min.			
1	9.972	.015	9.963	.008	9.964	.008		
2	9.984	.018	9.967	.009	9.969	.008		
3	9.960	0.0	9.960	0.0	9.960	.001		
4	9.959	.004	9.959	.001	9.959	.001		

Para el procedimiento ver capítulo V, sección 4.

En todos los casos a los 3 minutos, si no es que desde los 2 minutos, la lectura ha alcanzado su valor más reproducible, las desviaciones estándar ya no disminuyen más. En lecturas de cada día se observa una disminución de la desviación estándar de los promedios en el curso del tiempo alcanzando el valor mínimo a los 2 ó 3 minutos; de manera general puede afirmarse que las lecturas inician al tiempo $t=0$ con una desviación estándar máxima de alrededor de 0.050, para alcanzar valores cercanos a 0.010 unidades de pH a los 3 minutos.

Hay una diferencia importante en estos datos al compararlos con los de los estándares, ya que en los días sucesivos se ajustó previamente con los estándares 7 y 10 el electrodo. En la reproducibilidad estudiada, está involucrada la estabilidad del pH de la solución fisiológica, el que no se contamine o cambie por intercambio con el CO_2 del ambiente, o cualquier otra causa. Estos resultados son equivalentes a hacer las determinaciones de la reproducibilidad en milivoltios.



Reproducibilidad en 5 días sucesivos.

REPRODUCIBILIDAD DE LA LECTURA DE pH

Reproducibilidad en un mismo día. Promedio de 5 lavados sucesivos. Vol. 50 ml.

Día No.	Lectura t=0	t=½ min.	t=1 min.	t=2 min.	t=3 min.
1	7.392 \pm .006	7.389 \pm .004	7.390 \pm .003	7.392 \pm .004	7.392 \pm .004
2	7.357 \pm .051	7.381 \pm .016	7.381 \pm .014	7.387 \pm .014	7.389 \pm .014
3	7.372 \pm .021	7.365 \pm .012	7.365 \pm .010	7.368 \pm .008	7.369 \pm .008
4	7.344 \pm .022	7.401 \pm .010	7.405 \pm .008	7.413 \pm .003	7.416 \pm .001
5	7.341 \pm .059	7.377 \pm .022	7.381 \pm .019	7.389 \pm .013	7.392 \pm .011

Reproducibilidad en 5 días sucesivos.

Lavado #	Lectura t=0	t=½ min.	t=1 min.	t=2 min.	t=3 min.
1	7.365 \pm .032	7.377 \pm .021	7.380 \pm .020	7.390 \pm .018	7.395 \pm .018
2	7.360 \pm .070	7.390 \pm .013	7.389 \pm .012	7.389 \pm .016	7.388 \pm .019
3	7.369 \pm .013	7.379 \pm .019	7.380 \pm .020	7.384 \pm .022	7.387 \pm .021
4	7.360 \pm .018	7.380 \pm .021	7.384 \pm .021	7.393 \pm .019	7.394 \pm .019
5	7.351 \pm .050	7.386 \pm .017	7.389 \pm .016	7.394 \pm .016	7.393 \pm .017

T=30°C. Se preparó un stock de solución normal pH=7.400 el cual se guardó a 4°C durante los 5 días de lectura. Las lecturas se hicieron en agitación constante en un volumen de 50 ml. ajustando previamente el electrodo con std 6.990 y 9.996 m=97.4 \pm 1.3% (n=5). Los lavados se hicieron con agua desionizada a temperatura ambiente.

La cinética de lavado se intentó linearizar nuevamente tanto con una logarítmica, como respecto a $1/t^{1/2}$, como se muestra en la Figura VII-14, buscando la limitación en la cinética bien por un comportamiento capacitivo o bien por la difusión de los protones. La lectura del electrodo inmediatamente después de sumergirlo en una solución, no obedece claramente una cinética ni capacitiva ni difusiva. Un resultado análogo se obtuvo, Cap. VI en respuesta a la adición ácida.

Se realizaron evaluaciones de la reproducibilidad de la lectura de una solución Ringer en el curso de 4 días sucesivos. Se prepararon 250 ml de una solución, la cual se ajustó a 7.389 +/- estándares 7 y 10 ($m=98.07\%$). Se realizaron lecturas por triplicado a los 3 min. de lavar y colocar el electrodo en la solución, para estabilidad de la lectura, en volúmenes de 250 ó de 6 ml de la solución.

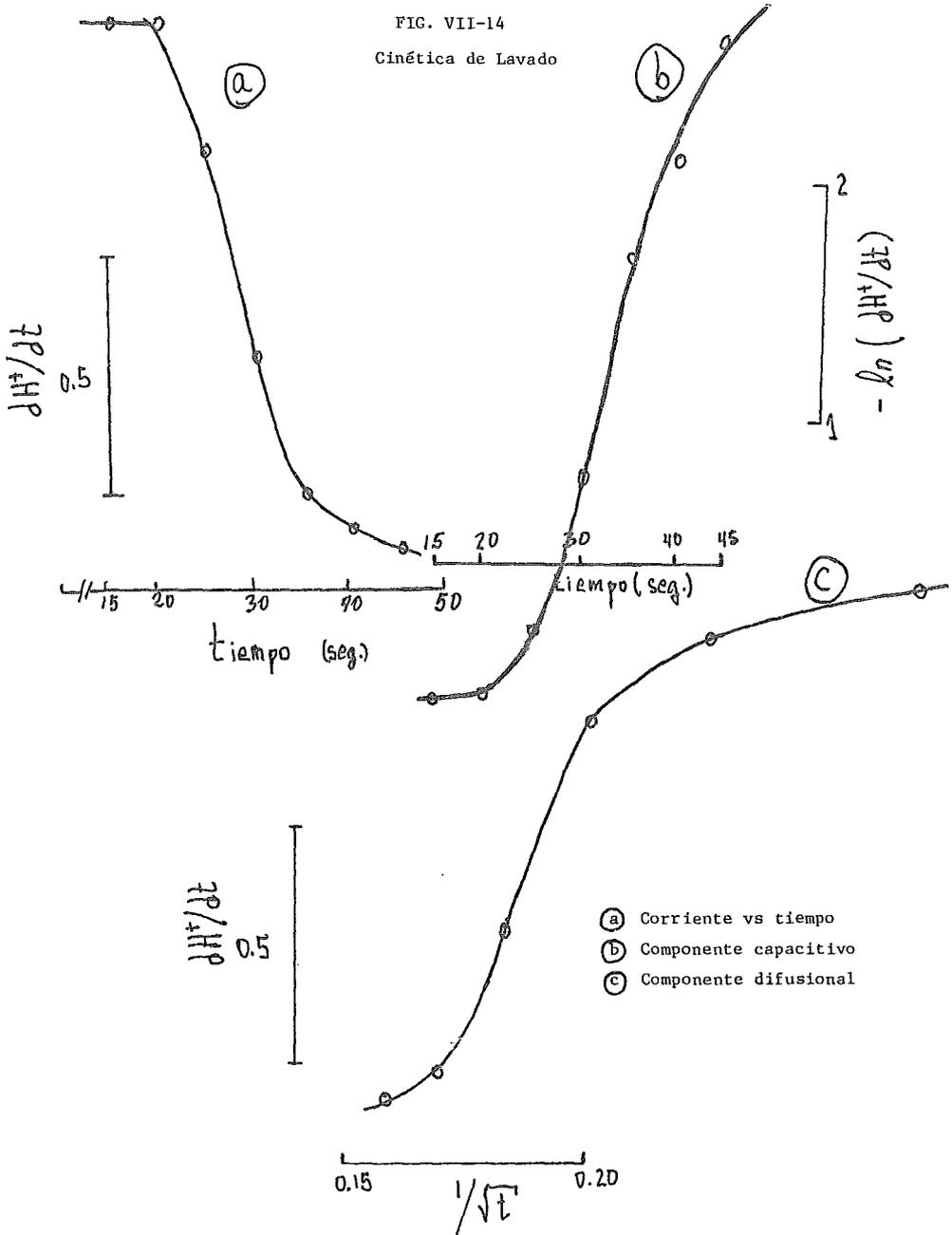
TABLA VII-4
REPETIBILIDAD DE LA LECTURA DEL pH.

Lecturas en un mismo día									
#	n	pH	±	D.S.	m(%)	Vol.(ml)			
1	3	7.309		.002	98.07	250			
2	2	7.422		.006	100.6	250			
3	3	7.398		.005	100.16	250			
4	3	7.412		.003	99.32	250			
5	3	7.401		.002	99.32	6			
6	3	7.403		.003	99.49	6			
7	2	7.397		.005	99.49	6			
8	3	7.397		.004		250			
9	2	7.402		.002					
Promedio:	24	7.402		.010					
Lecturas en días sucesivos									
Volumen: 250 ml					Volumen: 6 ml				
Día	n	pH	±	D.S.	Día	n	pH	±	D.S.
1	14	7.402*		.010	1	10	7.402*		.002
2	3	7.398		.005	2	3	7.401		.010
3	3	7.397		.003	3	3	7.396		.004
					4	3	7.403		.004

* Promedios del primer día, que se muestran arriba. Electrodo Sigma E-5003. pHmetro Corning. T=30°C. Ver Cap.V sección 4. La solución se guardó congelada cada día.

El primer día se realizaron 7 triplicados y 2 duplicados. En los tres días posteriores, se hicieron triplicados de lectura de la misma solución con diferentes volúmenes, en días sucesivos, previo equilibrio térmico de la solución. Los valores en los 4 días

FIG. VII-14
Cinética de Lavado



sucesivos no muestran diferencia significativa, como se observa en la Tabla VII-4. El valor promedio dió una D.S. de 0.010 y un $\text{pH}=7.402$. Nuevamente la desviación estándar es cercana a 0.010 unidades de pH. Estos resultados pueden compararse con las lecturas obtenidas previamente, con 50 ml, a los 3 minutos del lavado, Tabla VII-3. Las desviaciones estándar van de 0.001 a 0.014. El promedio de estas desviaciones estándar es de 0.008 ± 0.005 , que no es diferente de la obtenida ahora durante un solo día con 6 ml de solución. Esto indica que el valor de ± 0.010 tanto en la solución fisiológica, así como en los estándares, parece ser el valor más pequeño de desviación estándar en la repetibilidad de la lectura. Es decir que las determinaciones potenciométricas del pH con 5 lecturas sucesivas, independientemente de la capacidad amortiguadora de la solución es del orden de ± 0.010 unidades de pH, lo que concuerda con lo señalado en el artículo que establece la convención internacional del pH (Covington et al.1985).

Los resultados aquí presentados pueden resumirse en:

- i) La desviación estándar de varias repeticiones ($n=5$ a 8) de la lectura de pH es aproximadamente de ± 0.010 unidades de pH. Esto es independiente de la capacidad amortiguadora de la solución, para soluciones con fuerza iónica entre 25 mM, del estándar pH 4 y 160 mM de la solución fisiológica.
- ii) Después de lavar el electrodo para introducirlo a leer una solución cualquiera, el tiempo necesario para una respuesta estable es de 3 minutos.

VIII. EXACTITUD.

Una determinación puede ser reproducible, pero no exacta. Se requiere la evaluación por diferentes métodos para aproximarse al valor exacto o verdadero.

El objetivo de los experimentos que se muestran en este capítulo, es determinar la exactitud de la lectura potenciométrica del pH, utilizando una solución diluida de ácido clorhídrico, y contar con una curva estándar de acidificación de la solución Ringer.

La concentración utilizada del ácido es un compromiso entre un valor suficientemente elevado como para permitir su cuantificación por otros métodos, y suficientemente diluida como para poder hacer lecturas potenciométricas.

El ácido titulado, se utilizó para acidificar de pH 7.4 a 7, una solución Ringer cuyo único amortiguador es HEPES 1.6 mM. Al encontrarnos cerca del pK' del amortiguador, se obtendrá un intervalo lineal del cambio en el pH contra los moles de protones adicionados, lo cual es ventajoso para utilizarla como curva estándar en la determinación de eflujos celulares de protones. Se utilizó la concentración mínima de amortiguador de forma que el pH no se modifique por intercambio de CO_2 con el ambiente y se obtenga una sensibilidad máxima.

Se elaboró un programa que permite comparar las predicciones teóricas de la acidificación de la solución, con los datos experimentales. Las predicciones teóricas requieren además de conocer la concentración del ácido, otros datos como el pK del amortiguador, la variación del pK con la temperatura y la modificación del pK' con la fuerza iónica.

VIII.1. Determinación de la Concentración del Acido.

Se preparó una solución nominal de ácido 5mM a partir del ácido clorhídrico concentrado Baker $d=1.19$, pureza 37%, con agua desionizada. La determinación de la concentración de dicho ácido se realizó haciendo uso de tres métodos diferentes que son: Titulación volumétrica, titulación potenciométrica y lectura de pH con el electrodo de vidrio. (Ver Cap. V).

Para realizar la lectura de pH con el electrodo de vidrio, se elaboró un estándar de pH 2.6 (ácido cítrico y fosato disódico; Dawson et al. 1979) de 56.1 mM de fuerza iónica, ver Tabla IV-4, con el cual se calibró el pHmetro y se realizaron enseguida las lecturas, verificando una estabilidad de 2 minutos de lectura.

Con el pH obtenido se determinó la concentración del ácido haciendo uso de un coeficiente de actividad para el ácido 5 mM de 0.929 (Robinson y Stokes, 1970, Apéndice 8.9). El coeficiente de actividad que debe utilizarse no es el correspondiente a una concentración 5 mM ya que el estándar es 4.3 mM; sin embargo no podía utilizarse el de 4 mM ya que al inicio desconocíamos el valor de concentración correcta. Este problema solo puede resolverse de manera exacta utilizando métodos iterativos que aproximen simultáneamente los valores de concentración y de coeficiente de actividad. (Thomson y Ressick 1981).

Los resultados obtenidos, Tabla VIII-1, indican una concentración de 4.30 \pm .02 mM, con valores cercanos entre los diferentes

métodos.

TABLA VIII-1
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE HCl

METODO	n	pH \pm DS	a(H+) DS	C(H+) \pm DS
Titulación Volumétrica	10	----	-----	4.30 .03
Titulación Potenciométrica	3	----	-----	4.31 .08
Lectura de pH (Ajuste:Estándar pH 2.6)	9	2.401 .006	3.972 .055	4.27 .02
Promedio				4.29 .02

a(H+): Actividad de protones. C(H+): Concentración de protones.
DS:Desviación estándar. T = 25°C.

Las titulaciones volumétricas se determinaron con azul de bromotímol y las potenciométricas con electrodo de vidrio. Se adicionó NaOH previamente titulado con el estándar primario biftalato de potasio. Se utilizó 0.929 como coeficiente de actividad (Robinson y Stokes, 1970).Para discusión del coeficiente de actividad, ver texto arriba.

Como se mencionó previamente, se realizaron lecturas del ácido previo ajuste con diferentes estándares. Los resultados ilustran el error en la lectura por el ajuste del pH en valores muy alejados del pH de la muestra. Como puede observarse en la Tabla VI-2, el valor correcto de la lectura del pH se obtiene al ajustar el electrodo con el estándar pH 2.6.

VIII.2. Predicciones y Datos Experimentales.

El manejo teórico de las variables que afectan las mediciones del pH, se apreciará por el acuerdo que se logre entre la evaluación teórica y los datos experimentales. Con fines ilustrativos, se realizó para la solución HEPES 1.6 mM, fuerza iónica 100 mM, el cálculo teórico de tres maneras, con un programa Fig.VIII-1, iterativo de la ecuación de Henderson-Hasselbach, Figura VIII-2:

i) En la primera evaluación se considera la concentración de ácido errónea, ver Tabla VI-2, obtenida de la lectura de pH del ácido previo ajuste con los estándares 7 y 4. Se utiliza el pK' del HEPES a 30°C. Se considera la dilución del amortiguador por el volumen de HCl agregado.

ii) La segunda se realizó con la concentración correcta de 4.3 mM y las mismas consideraciones del cálculo anterior.

iii) En la tercera evaluación teórica, la más aproximada al experimento, se considera la concentración del ácido 4.3 mM y el pK'' del HEPES a 30°C corregido por la fuerza iónica. Se utilizó la ecuación de Henderson-Hasselbach según

$$pH_j = pK' + \Delta pK + \log(NS_{j-1} - X_j)/(HNS_{j-1} + X_j) \quad (1)$$

donde ΔpK es el logaritmo de la relación de coeficientes de actividad del amortiguador disociado (con carga negativa en un grupo sulfónico) y del no disociado (que está en forma de

FIG. VIII-1

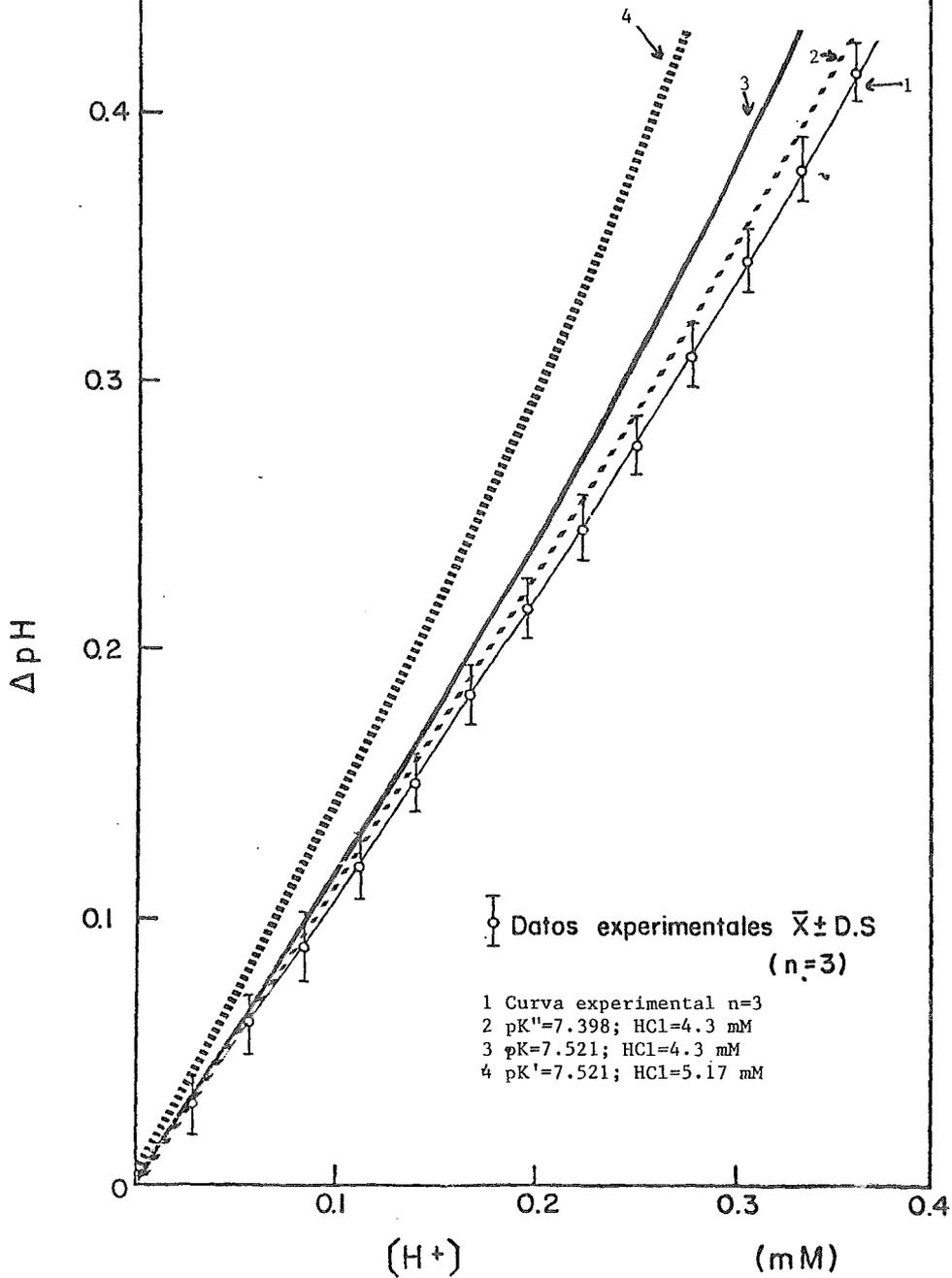
```

1  H(10),JM(40),BETA(40),B(40),HF,PH,PK,VOL,XHCL,HATT,
2  VAHCL,EXP,FM,KA,HM,B,DIEZ
   BYTE Q
100  DIEZ=10.0
      WRITE(5,*)'PH 1',PH,F,PK,VOL, [HCL], Vol HCL, Ha tot'
      READ(5,*)HF,PHF,PK,VOL,XHCL,VAHCL,HATT
      WRITE(6,190)
190  FORMAT(//,5X,'PH 1',4X,'PH F',4X,'PK',5X,'Vol',4X,'[HCL]',3X,
1    'Vol HCL',3X,'Ha tot')
      WRITE(6,180)HF,PHF,PK,VOL,XHCL,VAHCL,HATT
180  FORMAT(1X,7(2X,F6.3))
      J=1
      EXP=HF-PK
      FM=DIEZ**EXP
      HA(J)=HATT/(1+FM)
      A(J)=HATT-HA(J)
      KA=1/DIEZ**FK
      HM=1/DIEZ**HF
      B=(2.3*KA*HM*HATT)/((KA+HM)**2)
      WRITE(6,70)
70   FORMAT(//,1X,'NUM',4X,'PH',5X,'BPH',4X,'BETA',4X,'HCLF',4X,'HCL',
1    3X,'NS/HNS',4X,'HNS',5X,'NS')
      DO 7 I=1,40
      II= I
      HAT(I)=(VOL/(VOL+(II*VAHCL)))*HATT
      Y(I)=(VAHCL/(VOL+(II*VAHCL)))*XHCL
      A(I)=A(J)-Y(I)
      HA(I)=HA(J)+Y(I)
      F(I)=A(I)/HA(I)
      PH(I)=PK+ALOG10(F(I))
      DELPH(I)=HF-PH(I)
      H(I)=1/DIEZ**PH(I)
      JM(I)=II*Y(I)
      BETA(I)=2.3*KA*H(I)*HAT(I)/((KA+H(I))**2)
      J=J+1
      G(J)=DIEZ**(PH(I)-PK)
      HA(J)=HAT(I)/(1+G(J))
      A(J)=HAT(I)-HA(J)
50   WRITE(6,60)II,PH(I),DELPH(I),BETA(I),Y(I),JM(I),G(J),HA(J),A(J)
60   FORMAT(15,8(2X,F6.4))
      IF(PH(I),LE,PHF)GOTO 8
7    CONTINUE
8    Q='S'
      WRITE(5,80)Q
80   FORMAT(1X,'OTRA SERIE DE DATOS (S / N) [',A1,' ] : ',Q)
      READ(5,90)Q
90   FORMAT(A1)
      IF(Q.EQ.'N'.OR.Q.EQ.'n')GOTO 200
      GOTO 100
200  STOP
      END

```

30°C HEPS 1.6mM, Na CL 100 mM, $\text{pH}_i = 7.412 \pm 0.11$

FIG. VIII-2



zwitterión) (Good et al. 1966) y X_j es la concentración agregada en la j -ésima alícuota. Para el término de pK se utilizaron los coeficientes que provienen de la ecuación de Davies, según se indica en la Tabla IV-6.

La capacidad amortiguadora que puede expresarse como:

$$\beta = (2.3 K_a''(H^+)(C)/(K_a'' + (H^+))^2) \quad (2)$$

es función lineal de la concentración total C del amortiguador. En la Figura VIII-3 se muestra el cambio en pH esperado en la solución HEPES 1.6 mM, $I=100$ mM, a partir de un pH inicial de 7.4, utilizando el pK corregido tanto por temperatura como por fuerza iónica. Se observa que el intervalo lineal inicial de ΔpH es de aproximadamente 0.15 unidades de pH. Se descompone la modificación de la capacidad amortiguadora en dos componentes. Primero el proceso de dilución, a un pH constante de 7.4, que provoca una caída lineal de la capacidad amortiguadora. El segundo componente es exclusivamente el cambio en el pH y se muestra finalmente la disminución de la capacidad amortiguadora tanto por el efecto de dilución como por el cambio en el pH. La linealidad del ΔpH y de la capacidad amortiguadora en función de los m moles adicionados y la comparación con los datos experimentales, se muestra claramente en la Figura VIII-3.

Para la solución Ringer HEPES 1.6 mM, se muestra en la Figura VIII-4 el intervalo de linealidad teórico, de ΔpH y capacidad amortiguadora; predicción bastante cercana a lo obtenido experimentalmente como se observa en la Figura VIII-5.

Esta curva será útil como curva estándar en las determinaciones de eflujo ácido de sinaptosomas, capítulo XI. Se obtuvo una pendiente de 0.187 $pH/\mu mol$ de protones adicionados.

VIII.3. Diferencias por Agitación.

Hasta aquí las determinaciones que se muestran se han realizado en agitación constante. Se realizaron determinaciones del efecto de la agitación en el pH a diferentes fuerzas iónicas en soluciones de HEPES y Tris 1.6 mM.

TABLA VIII-2.
EFECTO DE LA AGITACION EN LA LECTURA DEL pH

$$\Delta pH = pH \text{ sin agitación} - pH \text{ con agitación.}$$

Fuerza Iónica (mM)	HEPES 1.6mM	Tris 1.6 mM
1.6	0.182+/- .021	0.178+/- .017
20	0.013+/- .001	0.025+/- .015
100	-0.002+/- .006	-0.006+/- .006

$T=30^{\circ}C$. La fuerza iónica se modificó por la adición de cristales de cloruro de sodio. $pH (I=1.6 \text{ con agitación}) = 7.40$. $pH \pm D.S. n=2$. El estándar se ajustó en agitación.

Los resultados se muestran en la Tabla VIII-2. Se realizaron asimismo determinaciones en soluciones con dos concentraciones de sacarosa, las cuales se utilizaron más adelante en la obtención de sinaptosomas (Ver capítulo XI). Los resultados y las condiciones experimentales se indican en la Tabla VIII-3.

TABLA VIII-3.
EFECTO DE LA AGITACION EN LA LECTURA DEL pH

$\Delta\text{pH} = \text{pH sin agitación} - \text{pH con agitación.}$

Fuerza Iónica HEPES 5mM (mM)	HEPES 5mM Sacarosa 0.32M	HEPES 5 mM Sacarosa 0.8M
2.5	0.101+/- .003	0.127+/- .059
10	0.026+/- 0.0	0.059+/- .005
20	0.015+/- .001	0.031+/- .001
70	0.004+/- .0005	0.006+/- .001
150	0.002+/- 0.0	-0.002+/- .005

T=30°C. Electrodo E-4878 pHmetro Corning. T=30°C. El electrolito soporte fue KCl. $\Delta\text{pH} \pm$ E.S. n=2. Cada muestra representa el promedio de 5 repeticiones. El estándar de pH se calibró con agitación. La lectura inicial de pH con agitación I=2.5 mM, fue de 7.40.

Se observa en todas las soluciones una disminución de la diferencia de lecturas, conforme aumenta la fuerza iónica. La diferencia entre la lectura con y sin agitación, se refiere en la literatura como ejemplo de los errores que provienen del potencial de unión líquida residual (Wescott, 1978). Sin embargo la magnitud del potencial de unión líquida, tanto en el modelo de Henderson como en el de Planck (Guggenheim, 1930), es independiente del grosor de la unión. La diferencia en las lecturas por la agitación, probablemente se explique por una alteración de la capa de difusión (Bard, 1980).

En resumen se determinó la concentración del HCl 4.3 mM por tres métodos diferentes, se muestra una lectura del pH exacta siempre y cuando se utilice un estándar de pH cercano al de la muestra, tal y como se recomienda (Bates, 1973). Se utilizó dicho ácido para acidificar dos soluciones HEPES 1.6 mM una con I=100 mM y otra I=160 mM. Con ambas se obtuvieron resultados concordantes con las respectivas evaluaciones teóricas.

Finalmente se observaron diferencias por agitación de hasta 0.18 unidades de pH a I=1.6 mM; esta diferencia fue disminuyendo conforme aumenta la fuerza iónica.

FIG. VIII-3

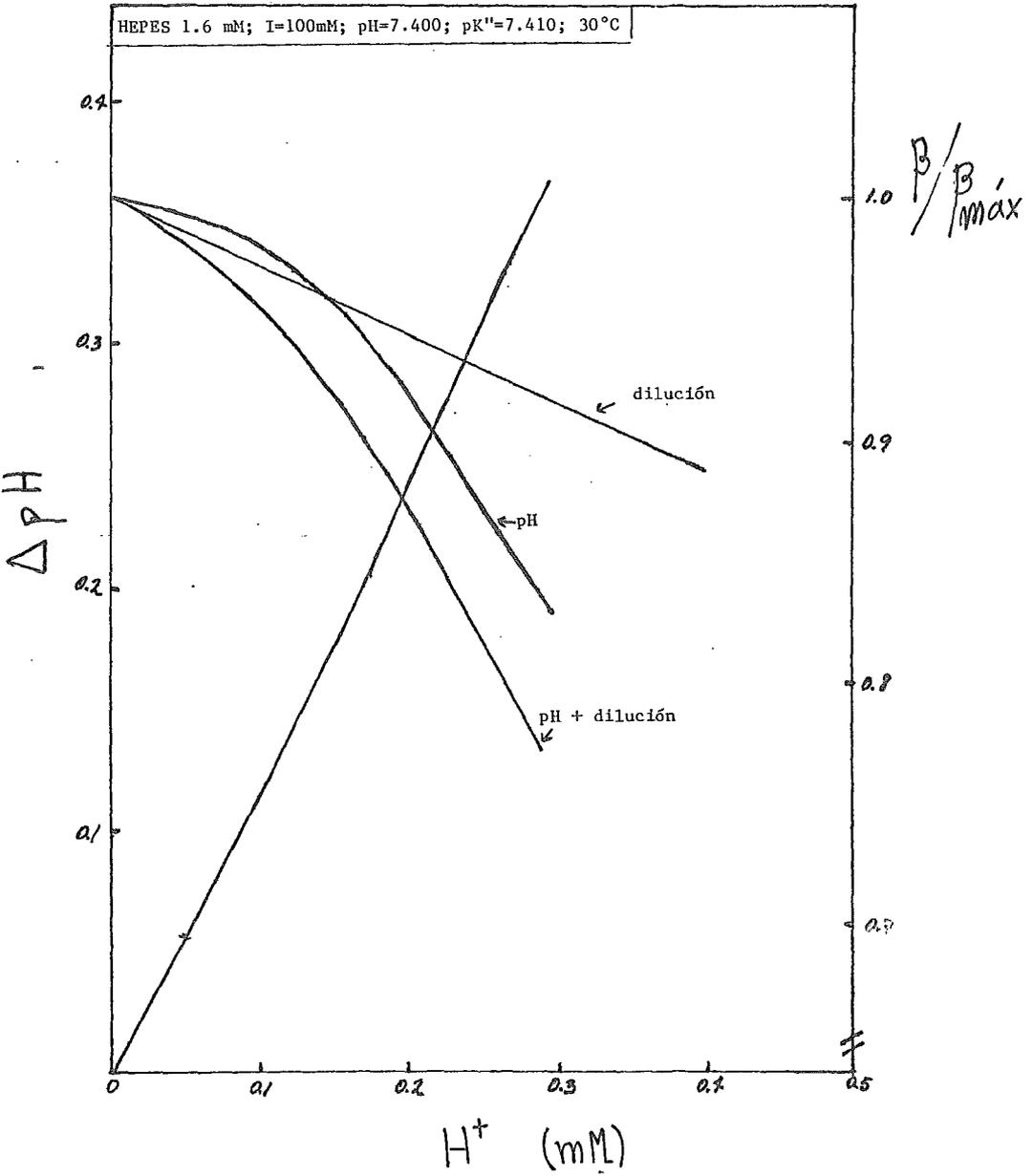
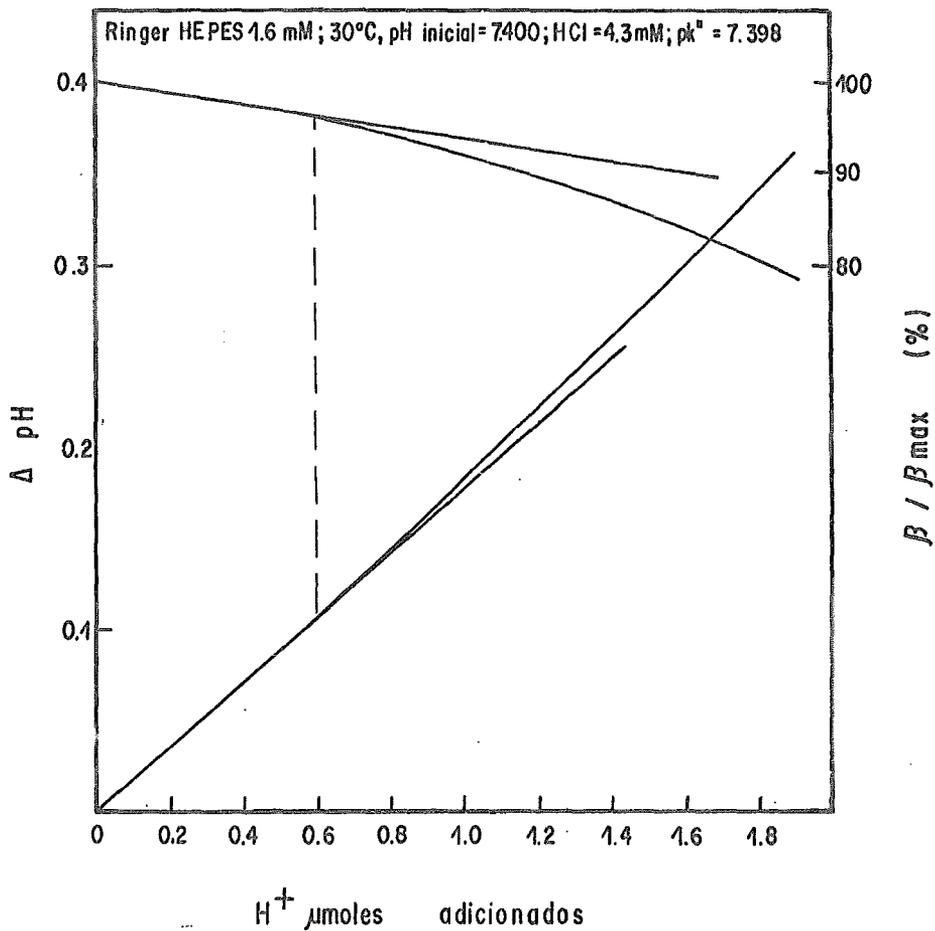
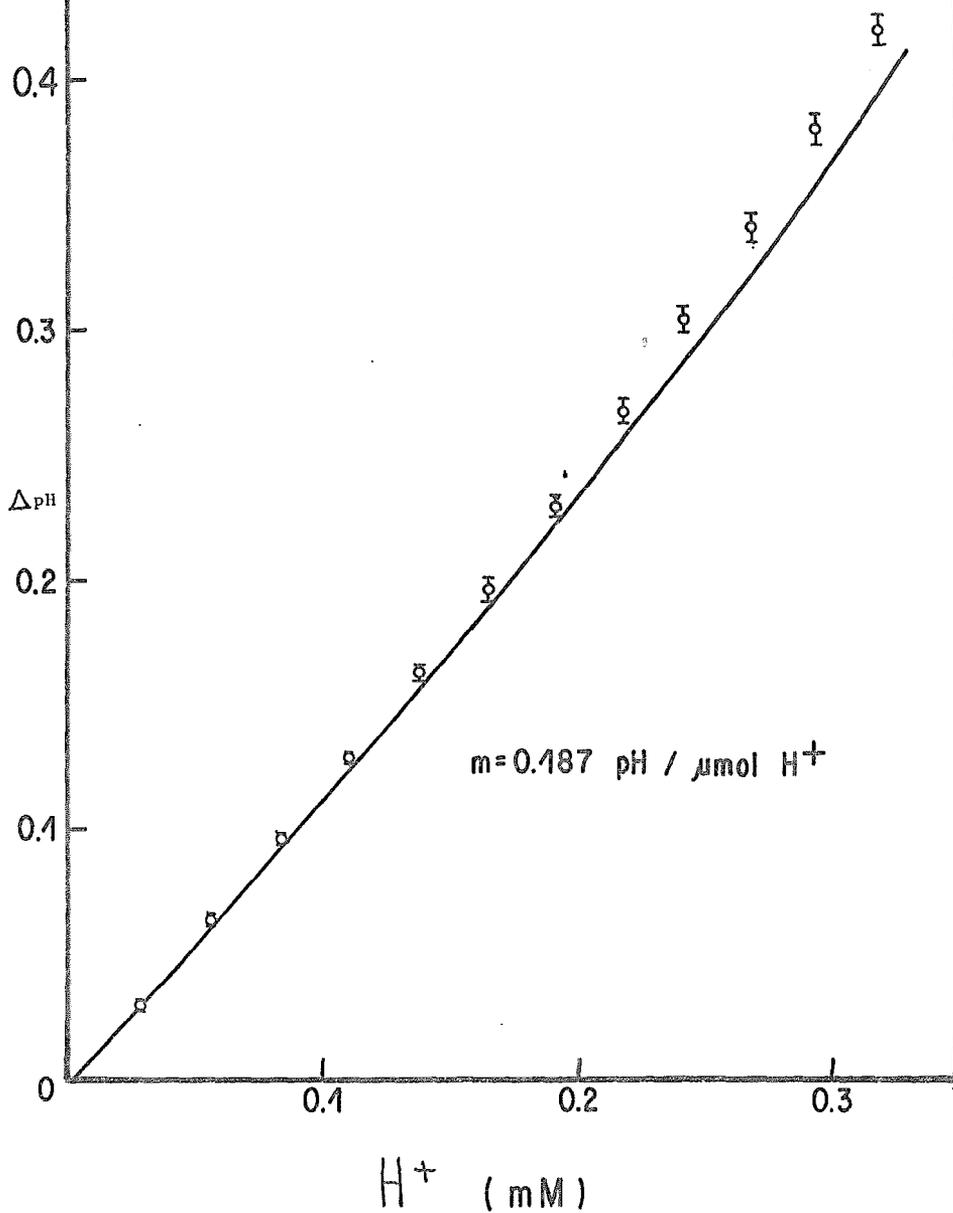


FIG. VIII-4



Ringer HEPES 1.6 mM; 30°C; n=3

FIG. VIII-5



IX. pH EN FUNCION DE LA FUERZA IONICA.

Los experimentos que se mencionan en este capítulo, tienen por objetivo poder entender y conocer la determinación potenciométrica de una solución amortiguada en función de la fuerza iónica, en el intervalo de baja fuerza iónica de 1.6 a 160 mM, haciendo uso del electrodo de vidrio.

La modificación de la fuerza iónica del medio altera la lectura del pH. Esto ocurre debido a dos mecanismos totalmente independientes. La modificación de la fuerza iónica como se mencionó anteriormente, alterará en cualquier solución los coeficientes de actividad de los electrolitos y por ende el pH de la solución. Por otro lado el potencial de unión líquida es función de la fuerza iónica. Al alterar la fuerza iónica de la muestra, el error por el potencial de unión líquida cambiará.

Los resultados que se muestran en este capítulo son las distintas determinaciones experimentales del pH en función de la fuerza iónica y la determinación experimental del potencial de unión líquida a distintas fuerzas iónicas. Los resultados experimentales obtenidos, se comparan con las respectivas predicciones, tanto con el tratamiento de Debye-Hückel para el coeficiente de actividad, como con la ecuación de Henderson para potenciales de unión líquida (ecuación 62 Cap.II).

IX.1. Soluciones de HEPES y de Tris.

1.a. Predicciones teóricas.

En las Figuras IX-1 y IX-2 se muestra respectivamente la variación teórica de los coeficientes de actividad del HEPES y del Tris. En la Tabla IX-1 se muestran los valores numéricos, que se obtuvieron haciendo uso de la ecuación de Davies, ecuación 27 Cap.IV, que es una adecuación experimental de la ecuación de Debye-Hückel. (Ver Tabla IV-6).

TABLA IX-1.
pK' DE HEPES Y TRIS EN FUNCION DE LA FUERZA IONICA.

Fuerza iónica (mM)	H E P E S		TRIS
	20°C.	30°C.	30°C.
1	7.661	7.521	7.935
10	7.616	7.476	7.965
20	7.600	7.460	7.981
40	7.574	7.434	8.000
70	7.661	7.421	8.019
100	7.550	7.410	8.030
160	7.538	7.398	8.046
200	7.525	7.385	8.056

Se utilizaron los valores de la ecuación de Davies, Tabla IV-6, y los coeficientes de variación de la temperatura $dpK/dT=0.014$ pH/°C del HEPES y -0.028 del Tris.

FIG. IX-1

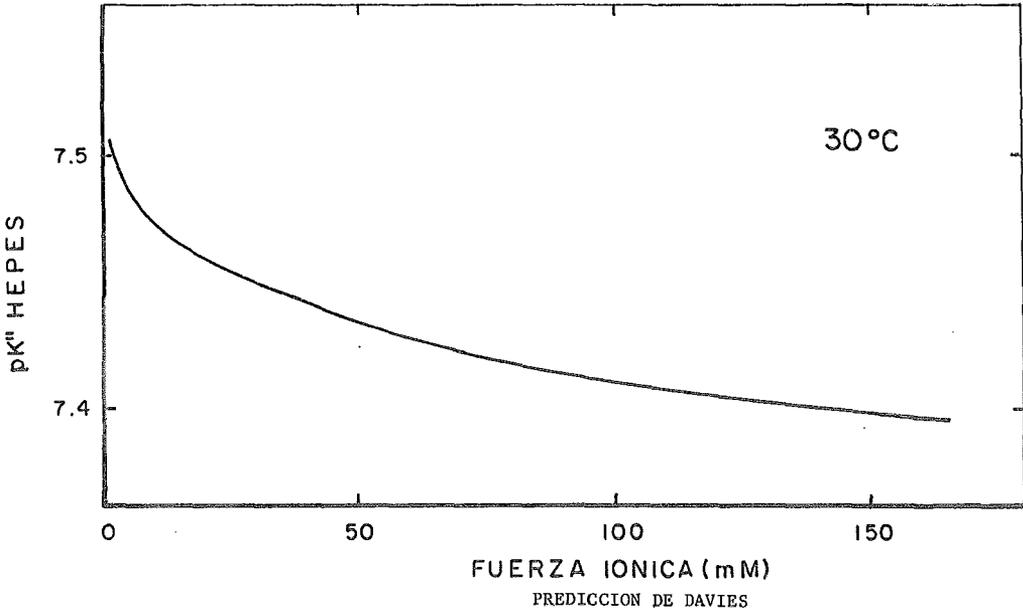
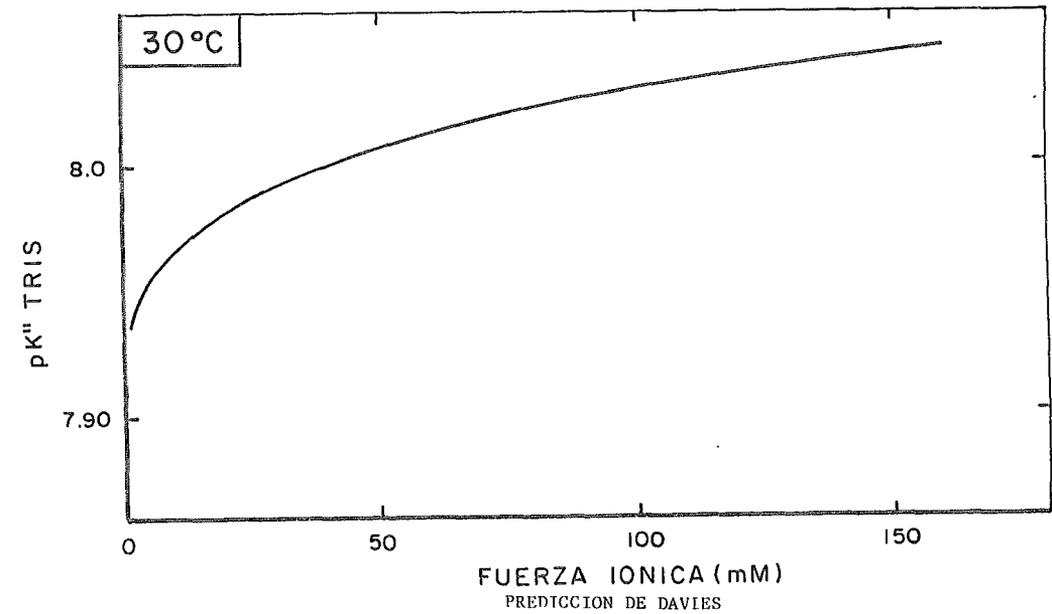


FIG. IX-2



Por otro lado se determinó el potencial de unión líquida utilizando la ecuación de Henderson II-62. Los valores se muestran en la Tabla IX-2. Se asignó un valor de potencial de unión líquida residual de cero a I=70 mM, ya que es la fuerza iónica del estándar Sigma pH 7. La suma algebraica de ambas contribuciones, Tabla IX-3, indica la predicción a obtener experimentalmente. Ver Figura IX-3.

TABLA IX-2
POTENCIAL DE UNION LIQUIDA SEGUN ECUACION DE HENDERSON.

Fuerza Iónica	E_{jx} (mV)	$((E_{jx}-1.95)F)/RT \ln 10$
1	3.99	-0.035
10	2.88	-0.016
20	2.55	-0.010
40	2.22	-0.005
70	1.95	0.0
100	1.78	+0.003
160	1.56	+0.007

T=30°C. Ecuación (62) Cap.II. $\lambda_{K^+}^0=73.5$, $\lambda_{Cl^-}^0=76.35$.

TABLA IX-3.

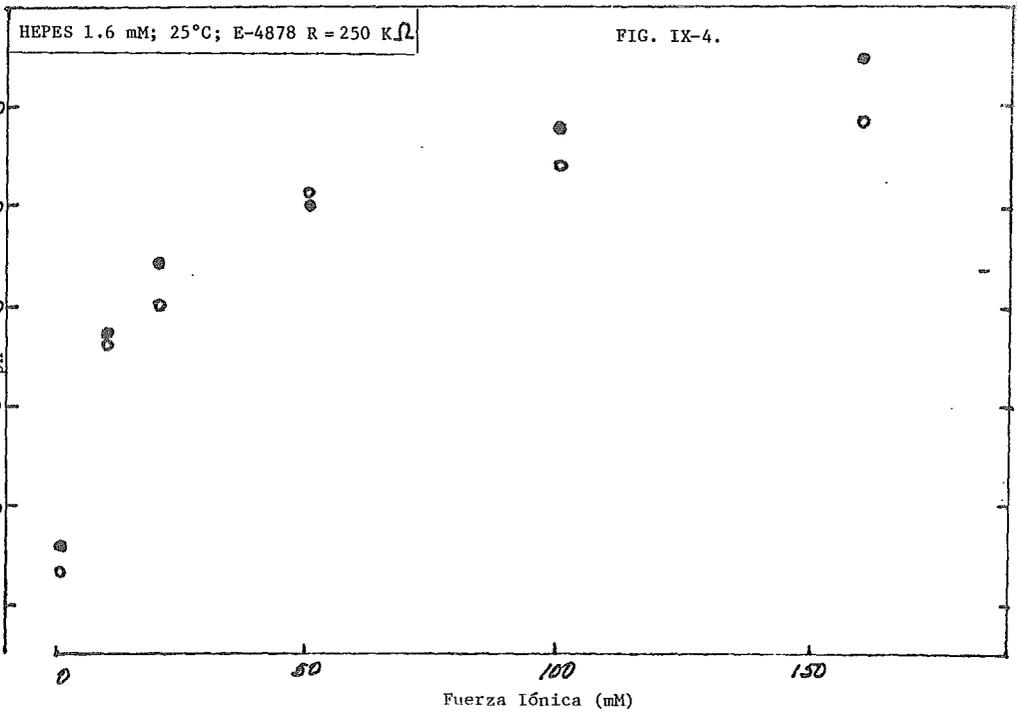
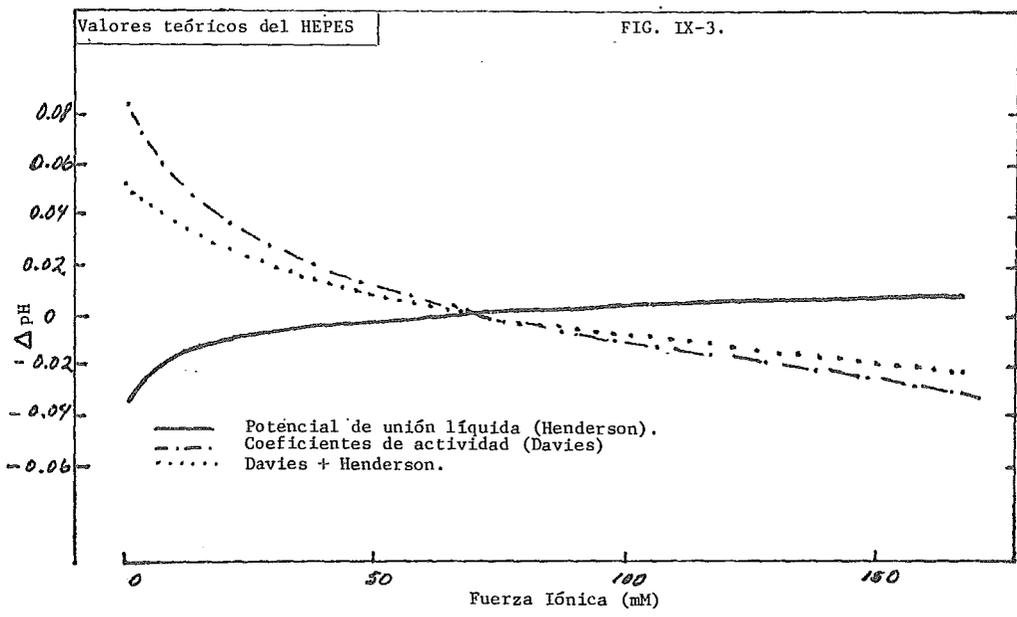
pH EN FUNCION DE LA FUERZA IONICA.
CONTRIBUCIONES DE LOS COEFICIENTES DE ACTIVIDAD DE LOS
AMORTIGUADORES Y DEL POTENCIAL DE UNION LIQUIDA.

Fuerza Iónica(mM)	HEPES	TRIS.
0.8	+0.049	-0.119
10	+0.038	-0.070
20	+0.028	-0.048
40	+0.014	-0.024
70	0.0	0.0
100	-0.008	+0.014
160	-0.027	+0.034

T=30°C.

1.b. Determinaciones experimentales.

La primera determinación del cambio del pH vs. I en soluciones HEPES (Ver metodología), se realizó con un electrodo E-4878 con resistencia a través del sello de cerámica de 250 K Ω . Se hicieron adiciones directamente en los 10ml de solución, de cristales de cloruro de sodio hasta llegar a 160 mM de fuerza iónica. Los resultados se muestran en la Figura IX-4. El incremento del pH en HEPES 1.6 mM, al pasar de 1.6 a 160 mM fue del orden de 0.4 a 0.5 unidades de pH. Enseguida se lavó el electrodo como se mencionó previamente, haciendo bajar la resistencia a 12 K Ω . Se repitieron



ron las determinaciones que se muestran en las Figuras IX-5 y 6; se observó un incremento total promedio de 0.28 unidades de pH. Con Tris a pH 7.4 se observó un incremento mucho mayor Figura IX-7, que con HEPES, resultado cualitativamente de acuerdo con las predicciones del cambio de los coeficientes de actividad del Tris en la misma dirección que del potencial de unión.

Posteriormente se hicieron determinaciones con un electrodo Sigma E-5003, similar al anterior. Se hicieron adiciones de NaCl, a 30°C, R=10.5K, obteniéndose un incremento en la fuerza iónica en el mismo intervalo, de 0.3 unidades de pH. Los resultados se muestran en la Figura IX-8.

Se realizaron asimismo determinaciones del pH en función de la fuerza iónica con un electrodo Sigma, nuevo E-4878, R= 3K Ω , el cual se utilizó al día siguiente de dejarlo equilibrando en 0.1M KCl. Los resultados obtenidos tanto en HEPES como en Tris, difieren notablemente tanto cualitativamente como cuantitativamente de las observaciones previas realizadas con otros electrodos, como puede observarse en las Figuras IX-9 y 10. Conforme se incrementa la fuerza iónica en la solución HEPES, el pH fue disminuyendo hasta I=70 mM. En la solución de Tris hubo un incremento que no fue tan grande como los observados con otros electrodos. Este comportamiento hace que la diferencia respecto a los valores teóricos sea mucho menor que en cualquier otra determinación anterior.

Sin embargo tiempo después, el mismo electrodo, con una resistencia ahora del orden de 10K Ω , dió resultados similares a los obtenidos con el electrodo E-4878 anterior. Ver Figuras IX-11 y las curvas de las determinaciones de unión líquida.

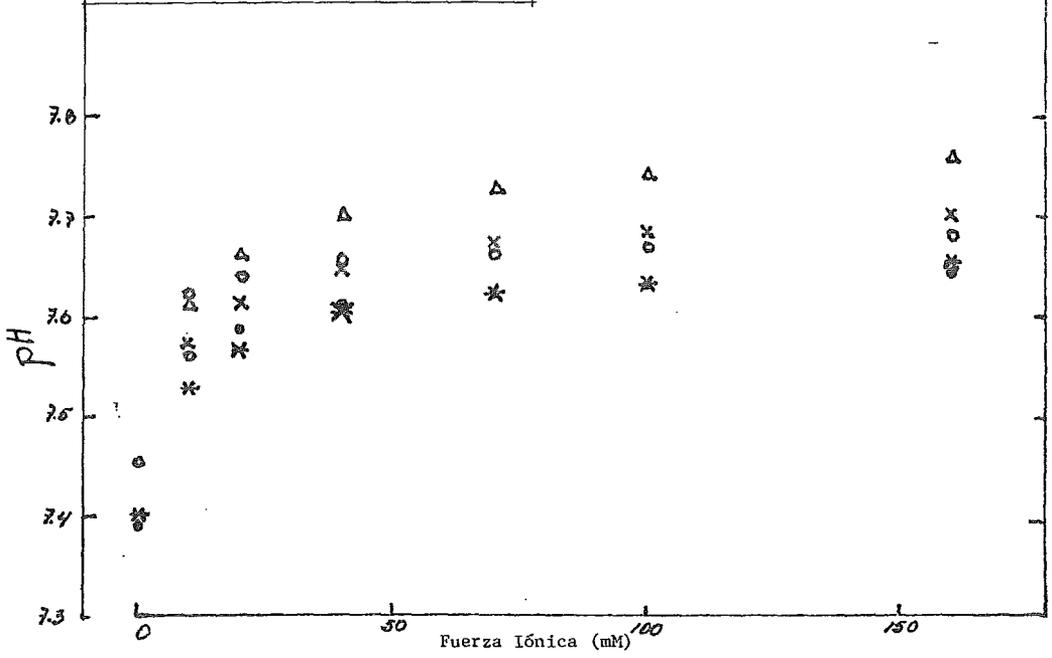
Posteriormente se hicieron determinaciones, esta vez con KCl, con un electrodo Mettler, R=2.5 K Ω , obteniendo incrementos cercanos a 0.5 unidades de pH. Los resultados se muestran en la Figura IX-12. Es importante mencionar que si bien este electrodo tenía una baja resistencia, frecuentemente se utilizaba para la determinación del pH de muestras con alta concentración de proteínas. Durante la adición de los cristales de KCl se observó un descenso del pH inmediatamente después de la adición de los cristales, seguido más lentamente del incremento al valor estable; comportamiento similar a otros electrodos después de haberlos sumergido en resina de intercambio catiónico. En cualquier otra ocasión el cambio en el pH se manifiesta inmediatamente en la misma dirección en que se estabiliza. Los resultados obtenidos con el electrodo Mettler, por lo tanto no son interpretables de la misma manera que los obtenidos con otros electrodos.

Se observaron incrementos del orden de 0.5 unidades de pH en las lecturas del pH con papel indicador en los extremos de 2.5 y 150 mM de fuerza iónica. En efecto la determinación colorimétrica utiliza ácidos o bases débiles cuyos coeficientes de actividad variarán según la fuerza iónica.

Si bien no se ha establecido una relación cuantitativa entre la magnitud del cambio del pH provocado por la fuerza iónica y la resistencia a través de la unión líquida; las determinaciones realizadas indican una cierta dependencia entre ambas variables. El incremento en la resistencia modifica las lecturas provocando un aumento del efecto de la fuerza iónica en la lectura del pH,

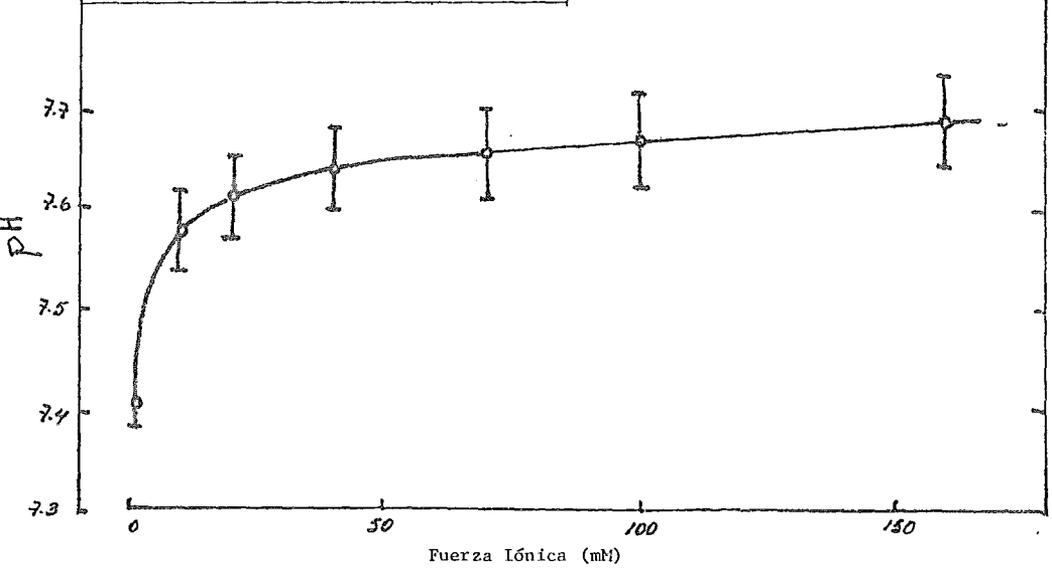
HEPES 1.6 mM; 30°C R = 12 K Ω ; E -4878

FIG. IX-5.



HEPES 1.6 mM; 30°C R = 12 K Ω ; Sigma E-4878

FIG. IX-6.



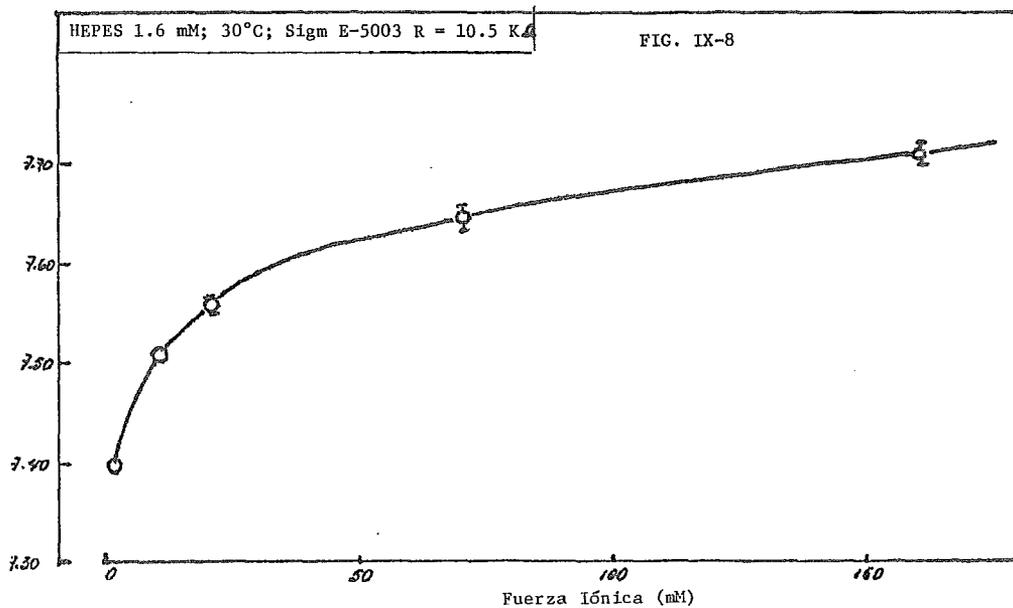
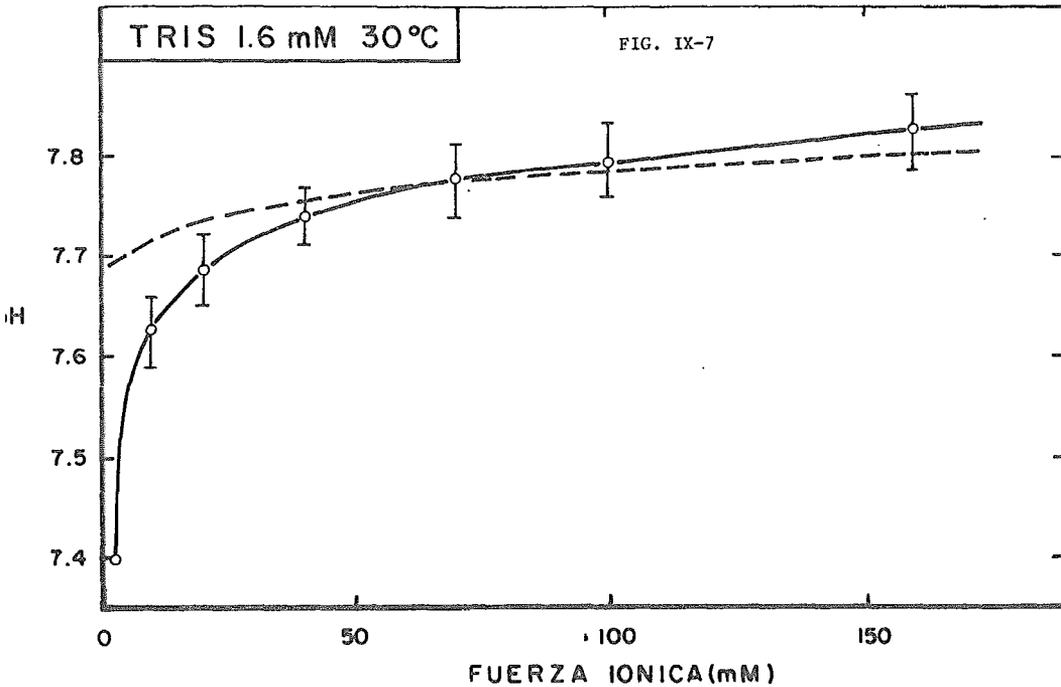


FIG. IX-9.

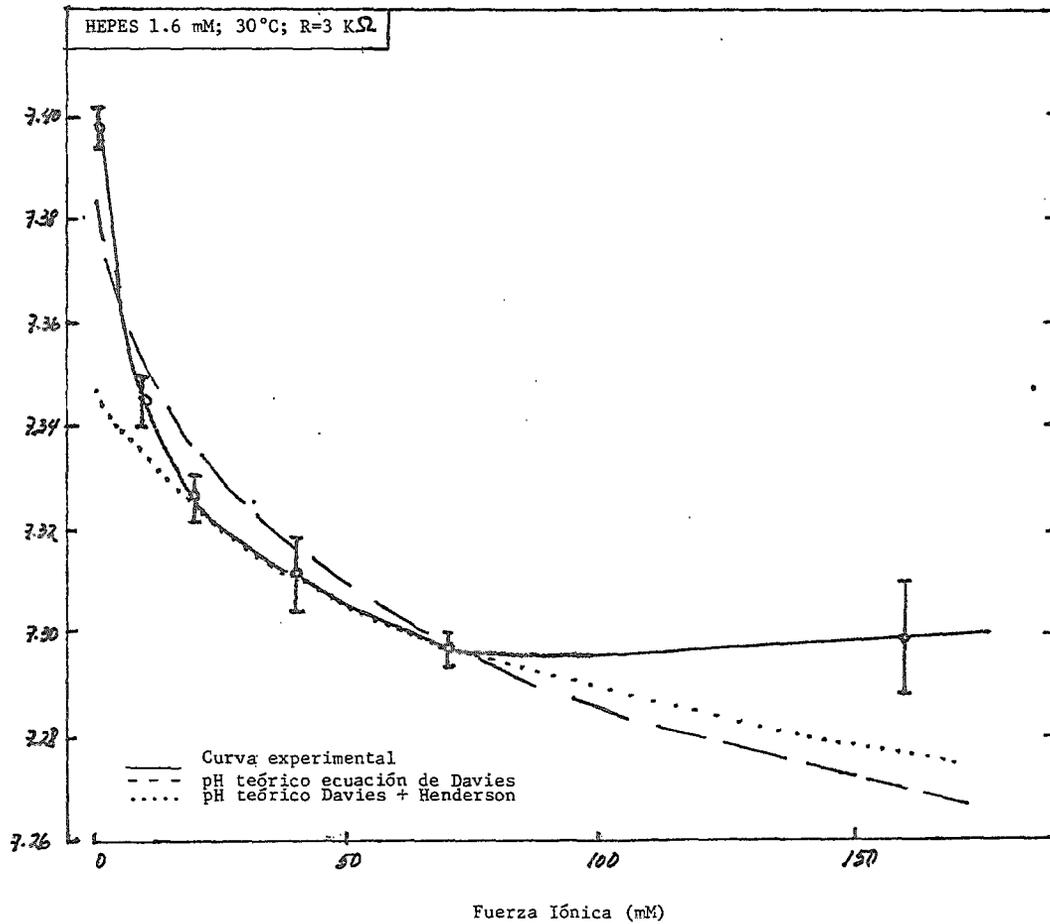


FIG. IX - 10.

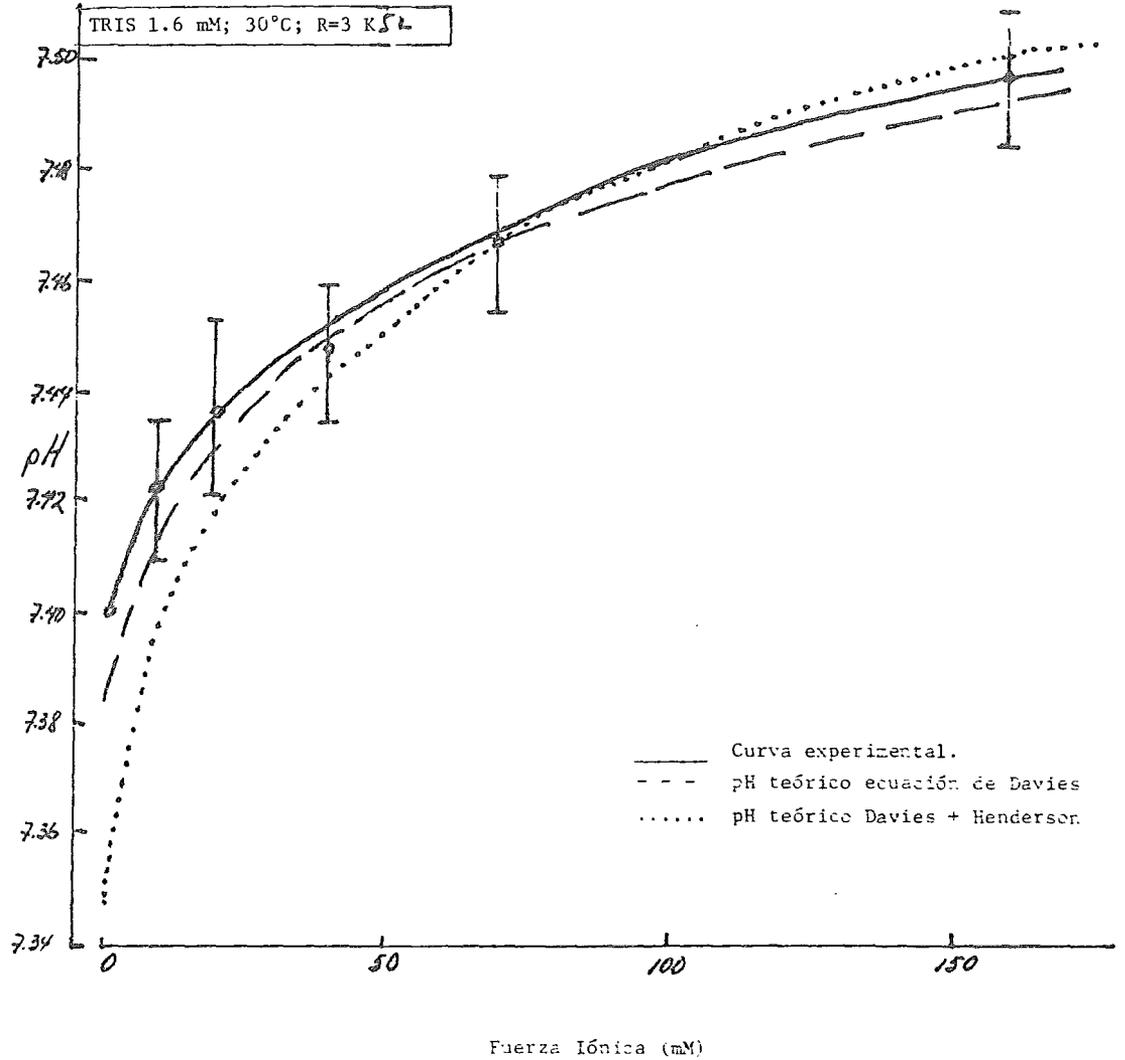


FIG. IX - 11

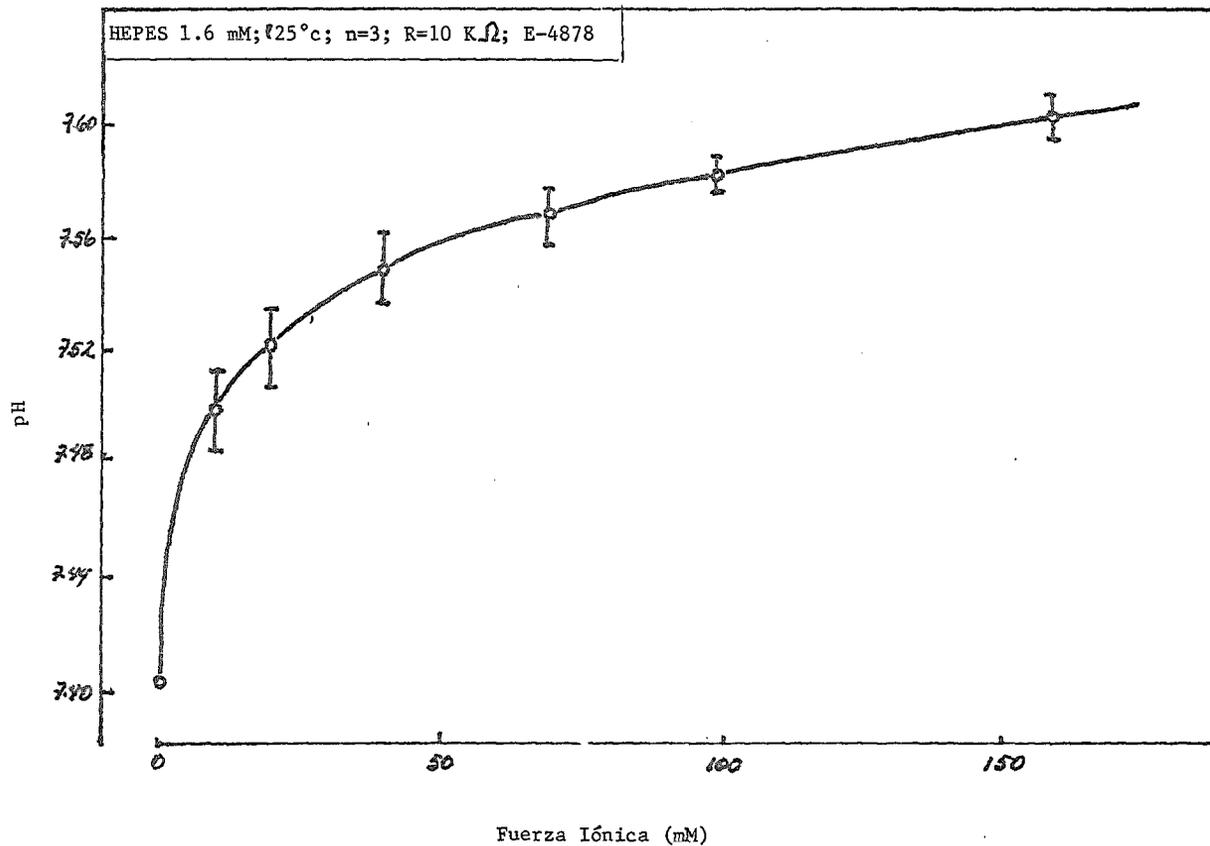
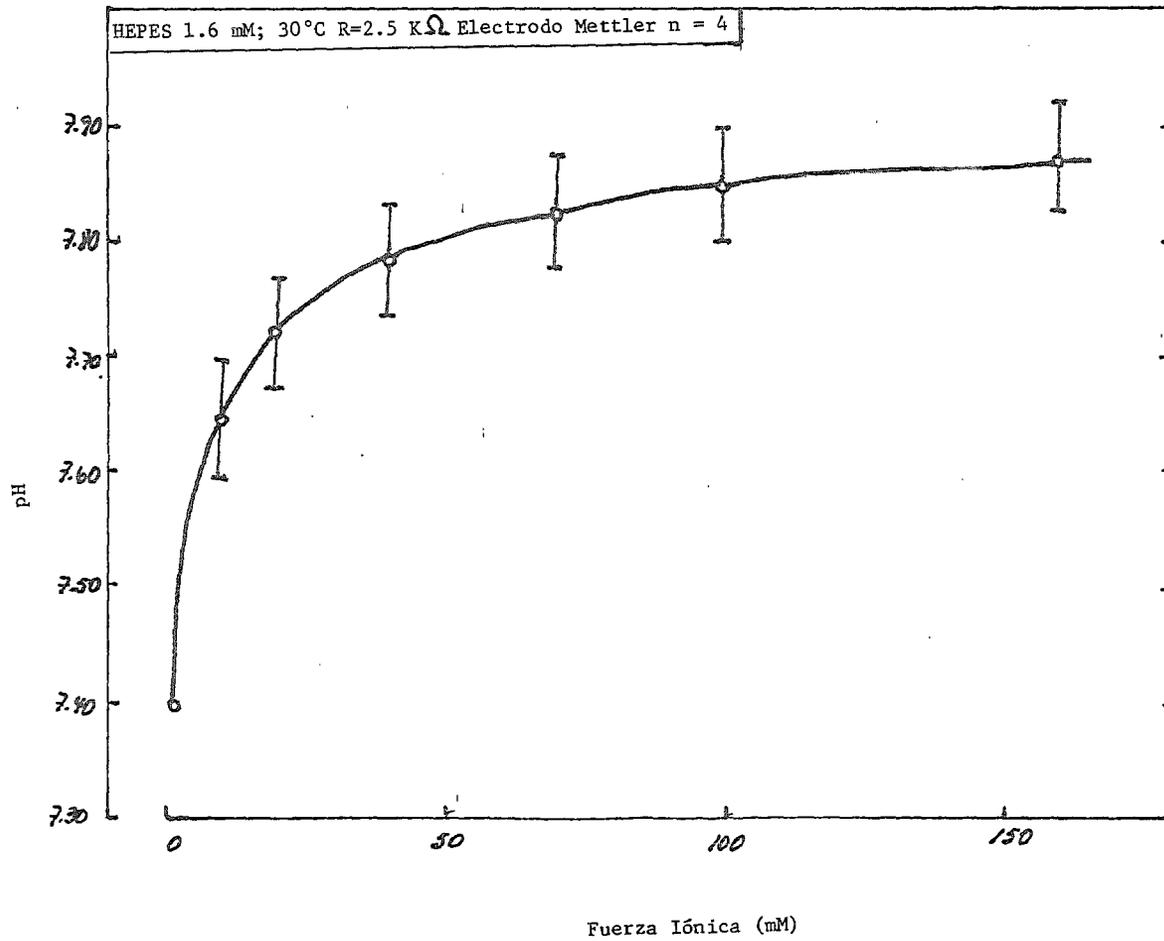


FIG. IX-12

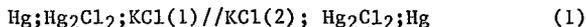


independientemente del amortiguador utilizado.

Los resultados que se muestran no se aproximan a las predicciones teóricas, excepto los realizados con el electrodo nuevo. Los resultados obtenidos parecen indicar que alguna de las suposiciones para el desarrollo teórico está equivocada. A continuación se muestran las determinaciones experimentales de la variación del potencial de unión líquida del sello de cerámica en función de la fuerza iónica.

IX.2. Evaluación Experimental del Potencial de Unión Líquida.

La celda utilizada en la determinación del potencial de unión líquida es



una celda homoiónica tal y como la señalada en la ecuación (41) del capítulo II.

El electrodo de lectura se encontraba en una solución saturada de KCl, mientras que la solución del segundo compartimento fue modificándose por la adición de KCl entre 1 y 160 mM.

Se realizaron los experimentos por triplicado a partir de una solución HEPES 1,6 mM ajustada con HCl a pH 7,4; con tres lecturas en cada fuerza iónica:

i) La lectura de la diferencia de potencial entre los electrodos de calomel.

ii) El pH_1 de la solución respecto al electrodo de referencia en KCl saturado con unión líquida.

iii) El pH_2 respecto al electrodo de calomel sin unión líquida, colocado directamente en la solución de KCl(2) variable.

En la Tabla IX-4 se muestra el potencial leído E_l , el teórico $E_t = E_1 + E_2$ entre los electrodos de calomel debido a la diferente concentración de KCl en que están inmersos y como el potencial E_j de unión resultante de la diferencia $E - (E_1 + E_2)$, (Ver Cap. II).

TABLA IX-4
POTENCIAL DE UNION LIQUIDA.

Fuerza Iónica (mM)	E_l	+/- D.S.	E_t	E_j
0	-20.3	0.9		
10	-9.8	0.4	97.4	-107.2
20	-7.2	0.2	80	-87.2
40	-4.7	0.3	61	-65.7
70	-3.3	0.4	50.3	-53.6
100	-2.8	0.3	42.1	-44.9
160	-2.2	0.2	31	-33.2

T=25°C. Vol. 10 ml. E_l : Potencial leído en la celda (1); E_t potencial de los electrodos de calomel ecuación (50) Cap. II; $E_j = E_l - E_t$. Los valores (mV) se corrigieron por el valor de E_l en KCl saturado (+/- 1mV) al final de las adiciones (n=3).

En la Figura IX-13 se muestra el potencial de unión líquida calculado según Henderson en línea punteada y se compara con el potencial leído E_1 de la celda. En la Figura IX-14 se muestra la determinación del pH_1 con unión líquida, similar a los registros previamente obtenidos. En la Figura IX-15 se muestra la determinación del pH_2 respecto al electrodo de calomel sin unión líquida, en el cual a diferencia del anterior, el pH disminuye con la fuerza iónica. Finalmente en la Fig. IX-16 se muestran los valores promedio de las lecturas de pH respecto a los electrodos con y sin unión líquida, bola negra y blanca respectivamente, mientras que la línea simple corresponde a la predicción de Debye-Hückel y la línea doble representa el pH obtenido a partir del potencial E_1 de la celda. Los valores se muestran en la Tabla IX-5. Al restar el potencial E_1+E_2 de los electrodos de calomel se obtiene E_j de entre 30 a 100 mV, lo cual es del orden de 10 veces mayor que lo habitual. Este E_j predice cambios en el pH de más de 1.5 unidades, lo cual no concuerda con las múltiples observaciones previas. Por otro lado, llama la atención la congruencia obtenida en la determinación del pH sin unión líquida, Fig. IX-15, con el pH teórico generado bajo la suposición de Debye-Hückel de coeficientes de actividad. En este caso, la participación del potencial E_1+E_2 de los electodos de calomel arruinaría la congruencia obtenida.

TABLA IX-5.
VALORES DE pH CORRESPONDIENTES AL POTENCIAL E_1 .

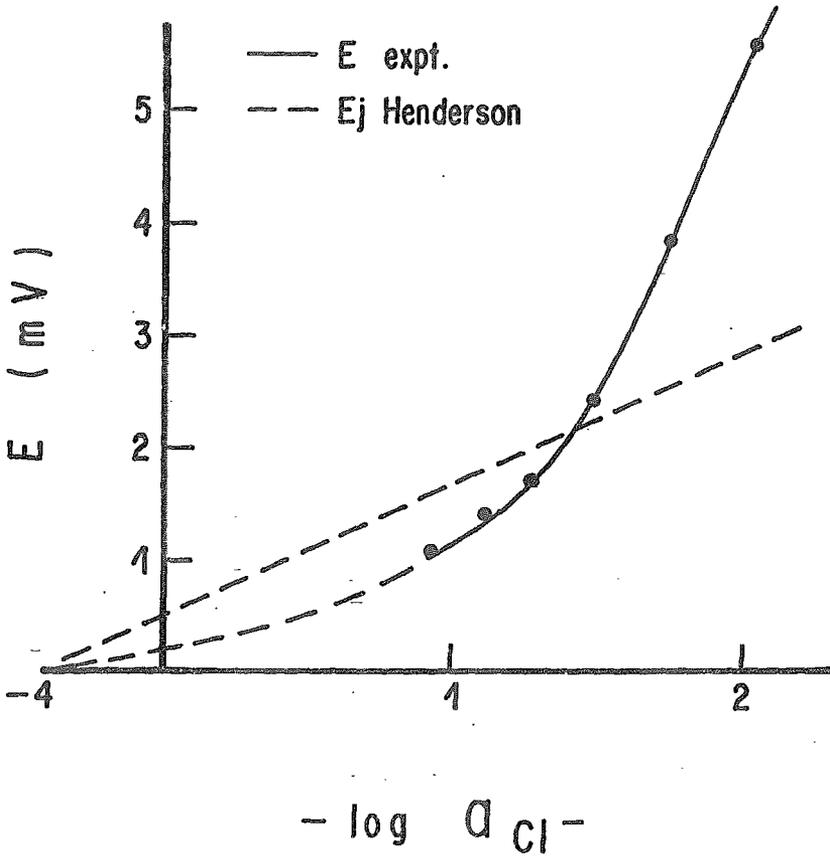
I (mM)	pH_1	+/- D.S.	pH_2	+/- D.S.	ΔpH
0	7.543	.031	7.917	.035	-0.374
10	7.679	.048	7.854	.029	-0.175
20	7.706	.048	7.837	.042	-0.131
40	7.725	.049	7.812	.034	-0.087
70	7.734	.047	7.796	.031	-0.062
100	7.733	.040	7.783	.025	-0.050
160	7.732	.034	7.775	.024	-0.043

T=25°C. Vol. 10 ml. I:Fuerza iónica; pH_1 respecto al calomel con unión líquida; pH_2 respecto al calomel sin unión líquida.
 $pH = pH_1 - pH_2$.

Efectivamente el potencial de Nernst de los electrodos de calomel, se manifiesta cuando dichos electrodos se encuentran en equilibrio respecto a las respectivas soluciones de KCl, lo cual requiere de dos o más días. Una manera más rápida de lograr el equilibrio es preparar los diferentes electrodos con la mezcla de calomel y KCl correspondientes a cada concentración. Sin embargo los experimentos que aquí se muestran se realizaron tomando un electrodo cuyo calomel contenía KCl saturado, que enseguida se colocó en las diferentes soluciones de fuerza iónica variable, durante aproximadamente una hora. A esto se agrega la difusión a través del algodón del capilar, ver Fig. II-1 que separa el calomel de la solución de lectura; por lo que puede pensarse que el electrodo de calomel utilizado no estaba en el equilibrio respecto al Cl^- de la solución de lectura.

FIG. IX-13

Potencial de unión líquida



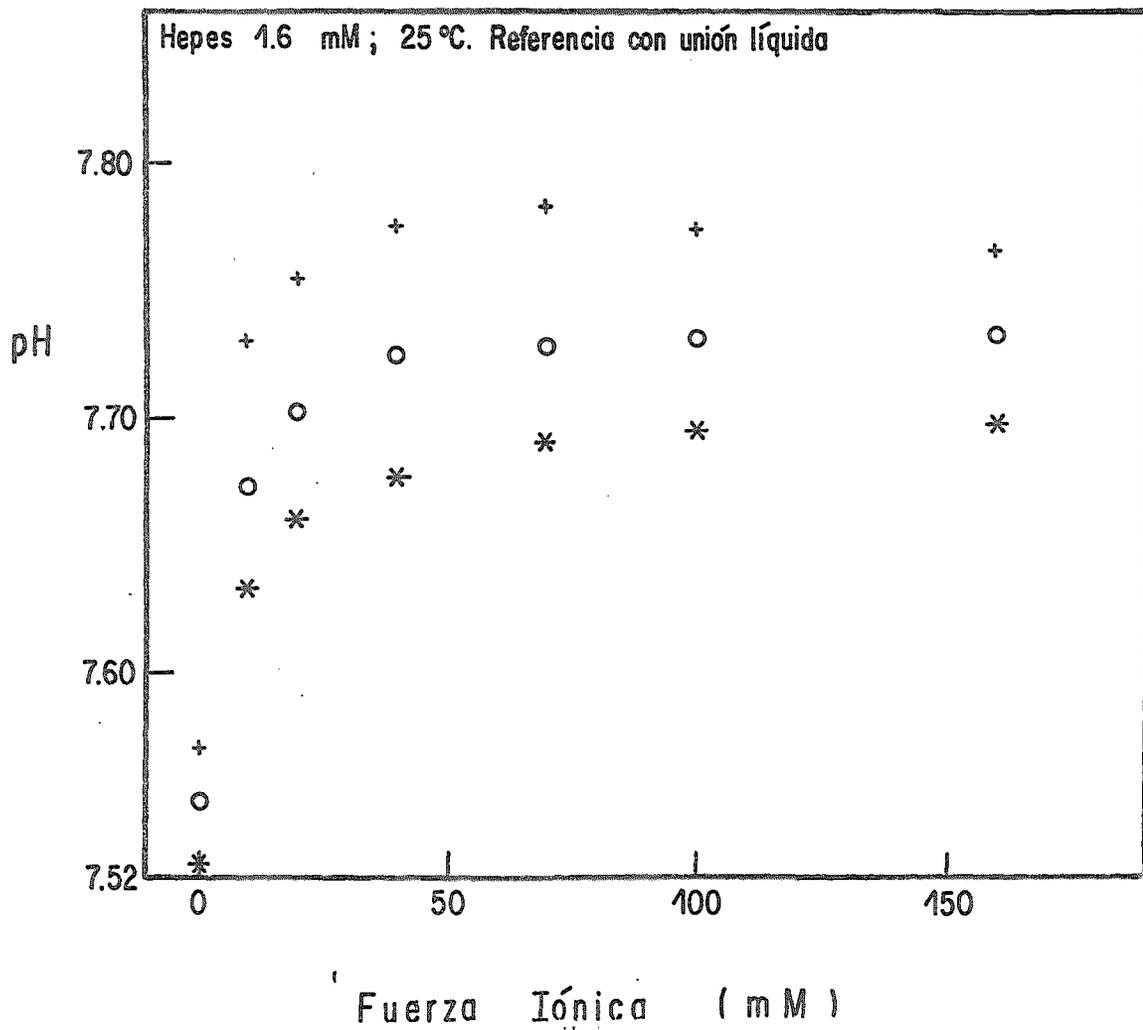
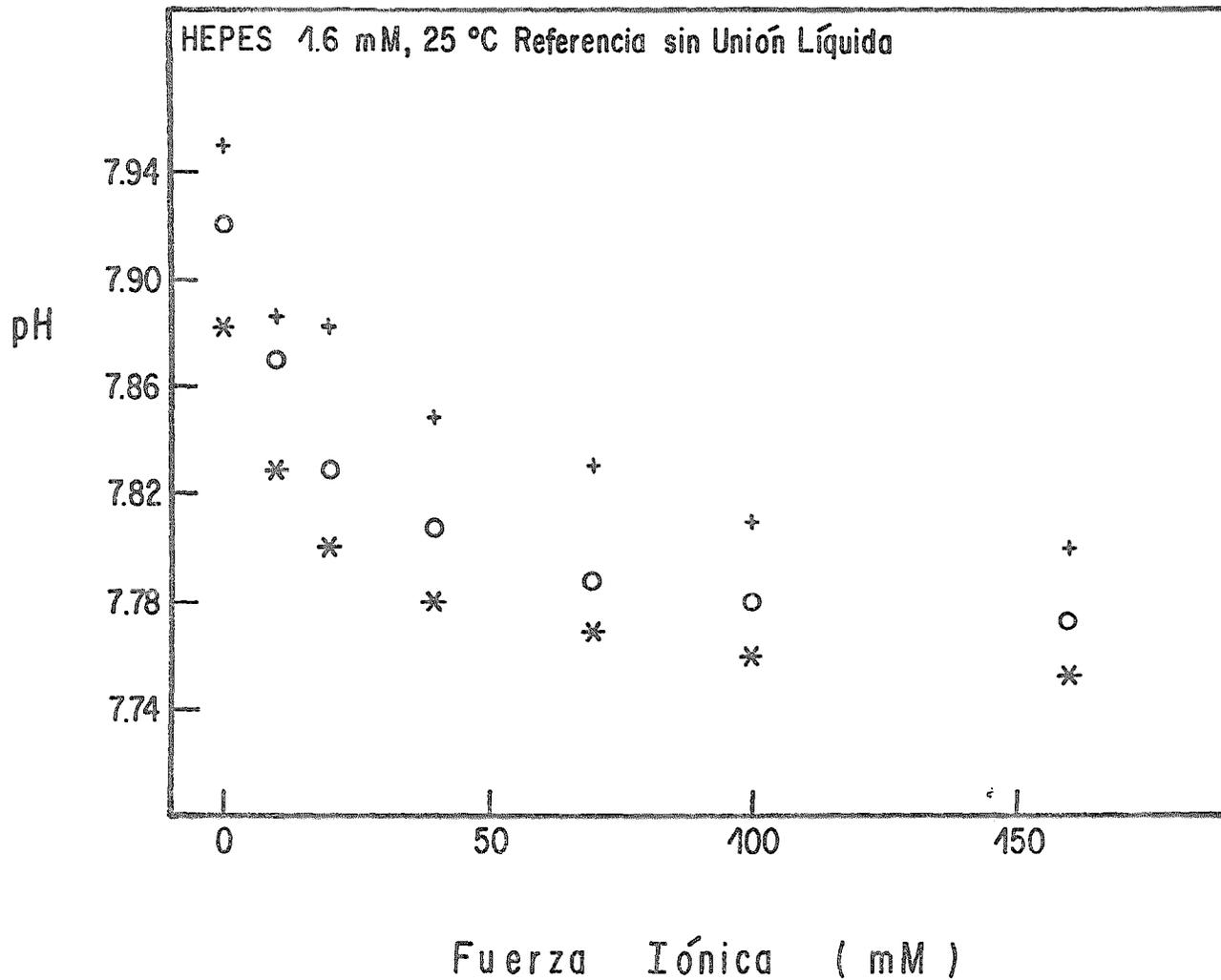


FIG. IX-15



En base a estas observaciones, resulta factible suponer que el electrodo de calomel inmerso en la solución (2), no es sensible a los cambios de KCl de 1.6 a 160 mM.

El potencial E_i de la celda es entonces es la diferencia de los potenciales de unión generados respectivamente por el sello de cerámica y por la unión entre el calomel con KCl saturado a través del algodón y la solución (2). Sin embargo de la congruencia observada entre el pH sin unión líquida, Fig. IX- 16 y la predicción de Debye-Hückel, podemos suponer que el E_j del algodón es despreciable en la medición y que el E observado es una buena aproximación al E_j del sello de vidrio poroso.

Al transformar el E celda en pH, se observa en la Fig. IX-16 una buena concordancia con el pH obtenido con la referencia con unión líquida. La concordancia mayor se dará al sumarle al potencial de unión el efecto del cambio en los coeficientes de actividad del HEPES.

Hemos determinado así, bajo las suposiciones mencionadas, el potencial de unión líquida de un electrodo comercial, el cual concuerda con la modificación de la lectura del pH por alteración de la fuerza iónica.

El potencial de unión líquida es un potencial en oposición respecto al E celda, en efecto recordando la definición operacional del pH(X) ecuación IV-9

$$\text{pH}(X) = \text{pH}(S) + \frac{E(S) - E(X)}{(RT/F) \ln 10} \quad (\text{IV-9})$$

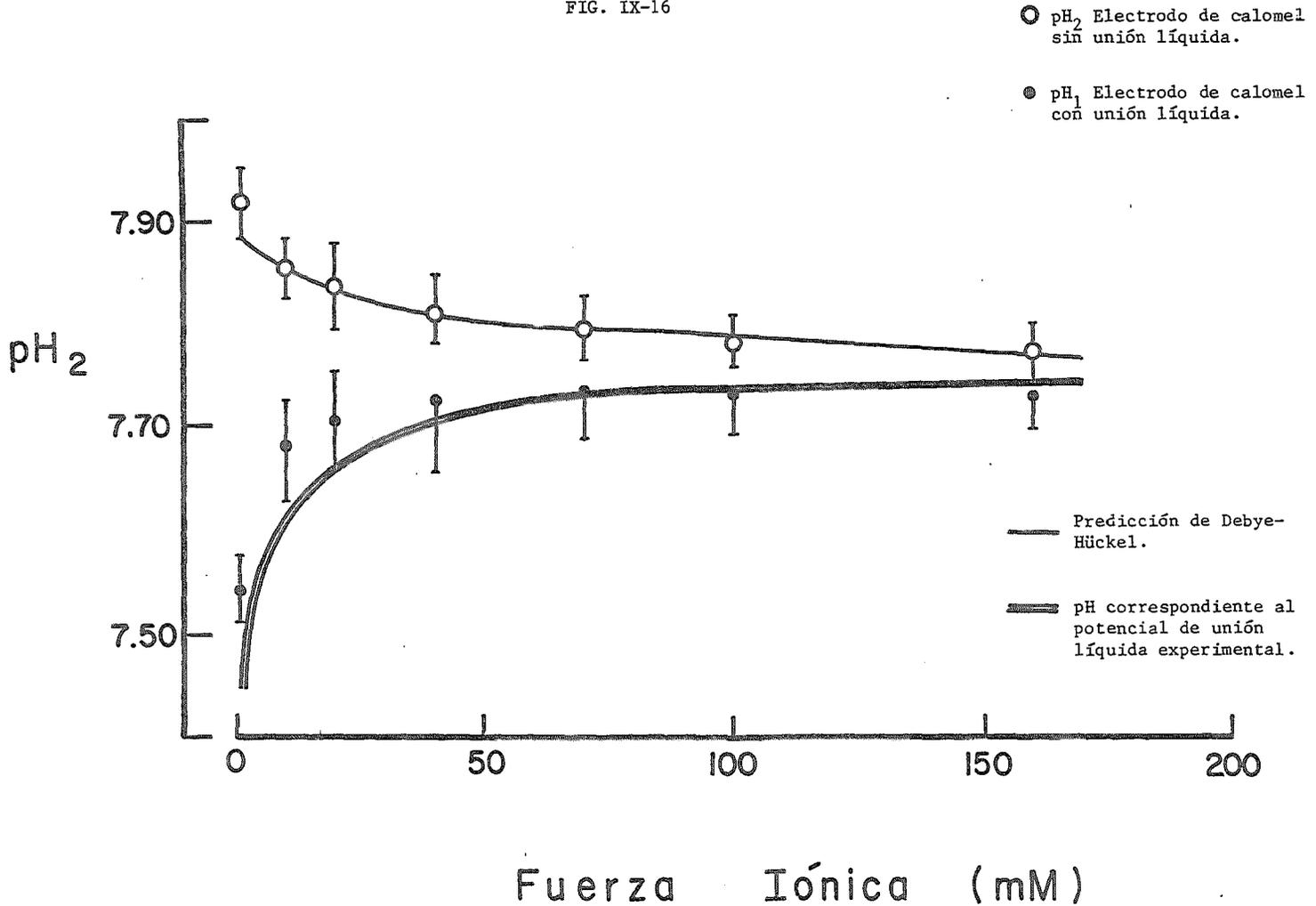
La lectura $E'(X)$ de una celda con unión líquida genera un potencial equivalente a un $E(X)$ aparente más pequeño, que coincide, con un pH más o pequeño o ácido.

La diferencia entre el potencial de unión líquida predicho por la ecuación de Henderson y el obtenido experimentalmente se explica cualitativamente por el tipo de unión con que se trabajó. En efecto el vidrio poroso establece una unión líquida de flujo restringido (Guggenheim, 1930) cuyas condiciones no son contempladas en las suposiciones del tratamiento de Henderson.

El resultado obtenido se explica cualitativamente suponiendo una unión del K^+ al vidrio poroso.

El vidrio está formado por silicatos con cargas negativas en la superficie, lo cual permite suponer que el ión potasio puede unirse a dichos grupos y retardar su flujo, mientras que el cloruro fluiría libremente. De la ecuación (II-2) se observa que el E del electrodo de calomel es función creciente de la actividad o de cloruros, por lo que el potencial en la solución diluida es negativo respecto al potencial en KCl saturado. Al unirse el K^+ a ciertos grupos negativos en el vidrio, disminuye su velocidad o movilidad, con una disminución del número de transporte del K^+ y una disminución del t_{Cl^-} ; esto traerá en consecuencia una mayor diferencia entre la movilidad de ambos iones y por lo tanto un aumento del potencial de unión líquida.

FIG. IX-16



En resumen hemos presentado en este capítulo, el efecto de la fuerza iónica en el intervalo de 1.6 a 160 mM en soluciones de HEPES y Tris poco amortiguadas, que señalan un error en baja fuerza iónica entre 0.5 y 0.2 unidades de pH más ácido, cuando se calibra previamente el electrodo con un estándar I=70 mM.

El error involucrado se debe al potencial de unión líquida, el cual no es predecible por la ecuación de Henderson ya que probablemente el número de transporte del potasio sea menor en el vidrio poroso, que en una difusión de gradiente lineal de la concentración.

Esta es sin duda una de las aportaciones más interesantes de la tesis.

X. EFECTO DE SUSPENSION.

La lectura del pH en suspensiones con partículas cargadas, como pueden ser suelos, resina de intercambio iónico o células se ve dificultada por el efecto Pallman o efecto de suspensión.

El efecto Pallman, es la modificación en la lectura del pH por la presencia de partículas con carga, en suspensión alrededor del electrodo de referencia, como se ilustra en la Figura X-1.

Hay dos explicaciones a esta observación. La primera lo atribuye a cambios en el potencial de unión líquida del electrodo de referencia, como consecuencia de una alteración de la movilidad iónica en la suspensión por la presencia en la solución de partículas cargadas (Jenny et al. 1950). La segunda lo explica por la aparición de un potencial tipo Donnan en la superficie entre la resina y la solución. (Brezinski, 1983).

Se evaluó dicho efecto utilizando resina de intercambio iónico Dowex-50 W(50X8-100) dry mesh 50-100, 8% cross linked tanto en una región de pH ácido cercano a 4, como cerca de la neutralidad con electrodo Sigma E-5003 como referencia y electrodo Beckman como electrodo de vidrio.

En la observación de las modificaciones de la lectura por la presencia de la resina, a pHs ácidos, el procedimiento fue:

Se tomaron 15g de resina, los cuales se lavaron dos veces con la secuencia de 100 ml de NaOH 1 M, agua desionizada, HCl 1 N, agua desionizada. Enseguida se dejó en HEPES 16 mM pH=7.4. Se tomaron 10 ml de resina y se lavaron tres veces con 50 ml de HEPES 16 mM, obteniéndose un pH final de 4.5.

Para las determinaciones en pH neutro, se tomaron cerca de 20 ml de resina, la cual se lavó dos veces con la secuencia de sosa y ácido mencionada previamente y enseguida se dejó equilibrando en una solución salina NaCl 2 M. Se hicieron 8 lavados agitando la resina constantemente, hasta que el pH con papel indicador que se obtuvo fue de 7. Se procedió enseguida a 7 lavados con agua desionizada para eliminar los iones no unidos a la resina y finalmente se colocaron 14 g. de resina en 80 ml de una solución HEPES 16 mM, pH=7.4.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas X-1 y 2.

Como puede observarse, en el intervalo ácido los valores aparentes de pH se ven grandemente modificados al introducir el electrodo de referencia en la resina, con lecturas hasta dos unidades más ácidas. La lectura de pH no se altera al introducir el electrodo de vidrio en la resina.

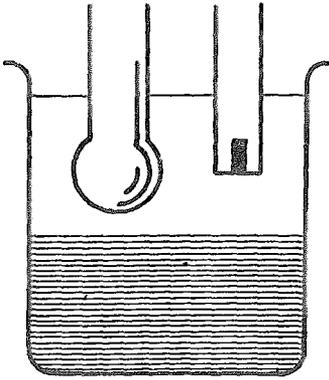
Se observó asimismo que si se coloca el electrodo de referencia en una solución sin resina y se cierra el circuito con un puente salino, el efecto Pallman sigue manifiesto.

Al adicionar 2 ml de NaCl 1 M, el pH bajó de 4.5 a 1.98. Esto puede explicarse por el intercambio de protones unidos a la resina por los iones sodio adicionados. Después de esta adición de NaCl, no se observó cambio alguno al introducir nuevamente el electrodo de referencia en la resina. Si la resina se lava nuevamente con ácido y sosa, el efecto se vuelve a manifestar.

Los resultados en el intervalo de pH cercano a la neutralidad se muestran en la Tabla X-2. Se determinó el pH de la solución en

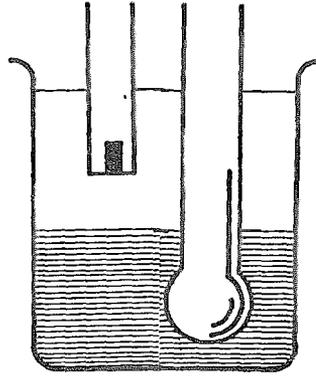
FIG. X-1
EFECTO DE SUSPENSION

(1)



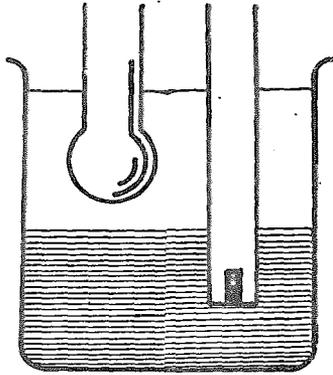
pH_1 : SOBRENADANTE.

(2)



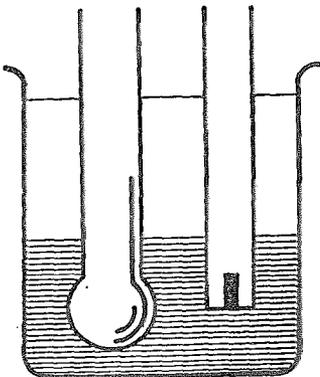
pH_2 : ELECTRODO DE VIDRIO EN RESINA.

(3)



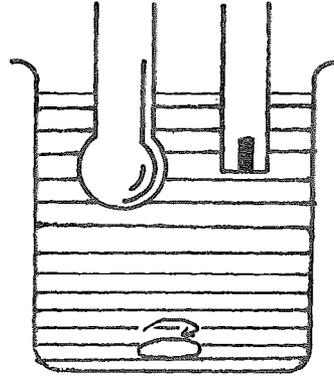
pH_3 : ELECTRODO DE REFERENCIA EN RESINA.

(4)



pH_4 : AMBOS ELECTRODOS EN LA RESINA.

(5)



pH_5 : SUSPENSION EN AGITACION.

reposito; enseguida al agitar vigorosamente, la resina baña los electrodos y se obtuvo la lectura en la suspensión. Se introdujo el electrodo de referencia en la resina depositada en reposo en el fondo del vaso de precipitado. Por último se leyó nuevamente el pH de la solución, previa adición de cristales de NaCl. De esta forma se realizaron lecturas a diferentes fuerzas iónicas, en dos condiciones de concentración de resina bañando al electrodo de referencia. Los resultados se muestran en las Figuras X-2 y X-3.

TABLA X-1.
EFECTO PALLMAN EN REGIONES ACIDAS DE pH.

pH ₁	pH ₂	pH ₃	pH ₄	pH ₅
4.50	4.49	1.88	1.86	4.29
4.44	4.47	1.85	1.90	4.28

T=25°C. Electrodo de referencia E-4878. Electrodo de vidrio Beckman. pHmetro Corning. Ver Fig.X-1 para la colocación de los electrodos.

TABLA X-2
EFECTO PALLMAN EN pH CERCANO A LA NEUTRALIDAD.

I (mM)	pH ₁	DS (n)	pH ₂	DS (n)	ΔpH ₁	DS	ΔpH ₂
8	7.47	.006(3)	7.37	.013(2)	0.100	.014	0.560
20	7.46	.007(2)	7.42	.00(3)	0.040	.014	0.270
70	7.47	.001(3)	7.46	.00(3)	0.014	.001	0.100
150	7.51	.002(3)	7.50	.001(2)	0.005	.001	0.068

T=30°C. Electrodo de referencia E-4878, de vidrio Beckman. pHmetro Corning. I: Fuerza iónica por adición de NaCl. Ver Fig.X-1 para la colocación de los electrodos.

ΔpH¹= pH sobrenadante - pH suspensión.

ΔpH²= pH sobrenadante - pH ref. en resina.

En la Figura X-4 se muestra la relación entre el ΔpH (pH sin resina - pH con resina) que obtuvimos, en función del logaritmo de la concentración de NaCl adicionado.

Tasaki y Singer (1963) determinaron la diferencia de potencial entre dos electrodos de calomel al introducir uno de ellos en resina de intercambio iónico. Ellos encontraron una relación lineal entre la diferencia de potencial y el logaritmo de la concentración de NaCl del medio.

FIG. X-2

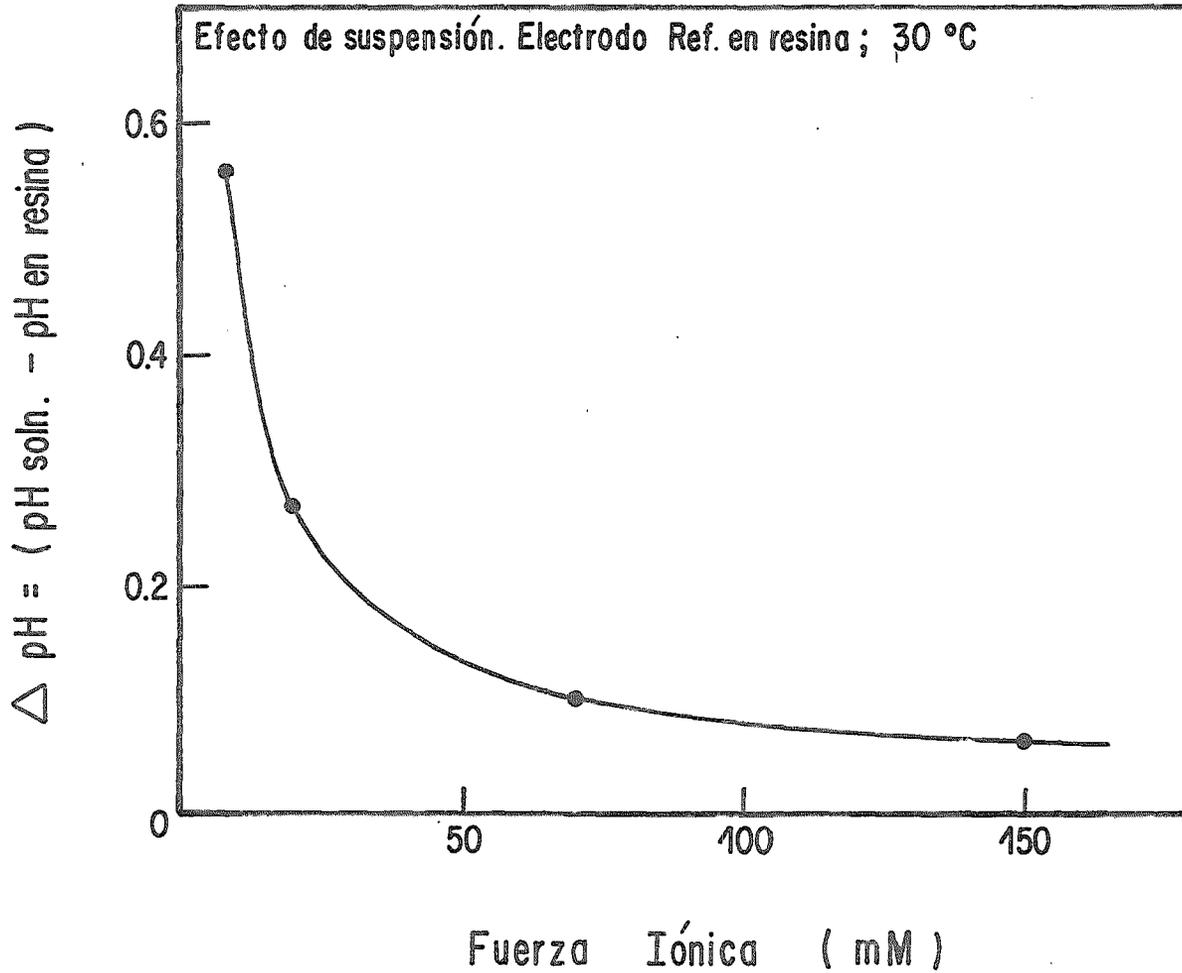


FIG. X-3

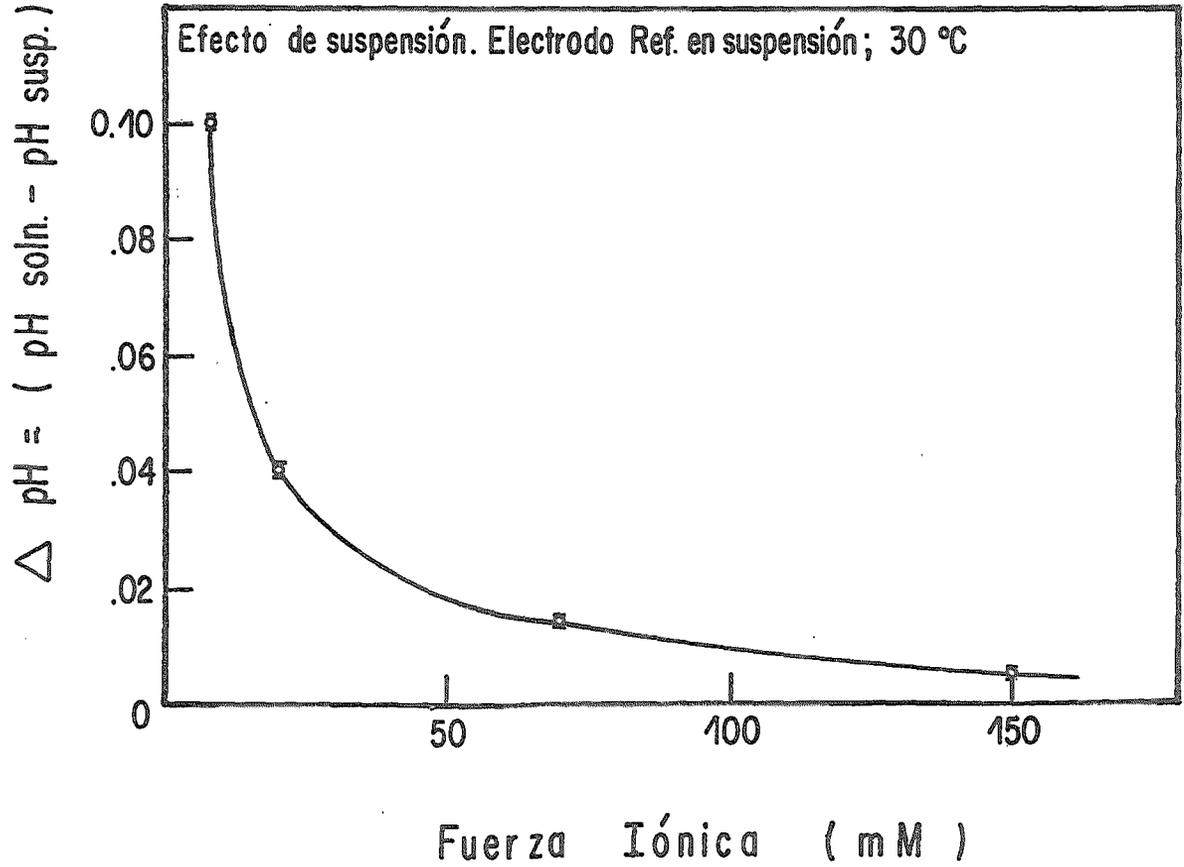
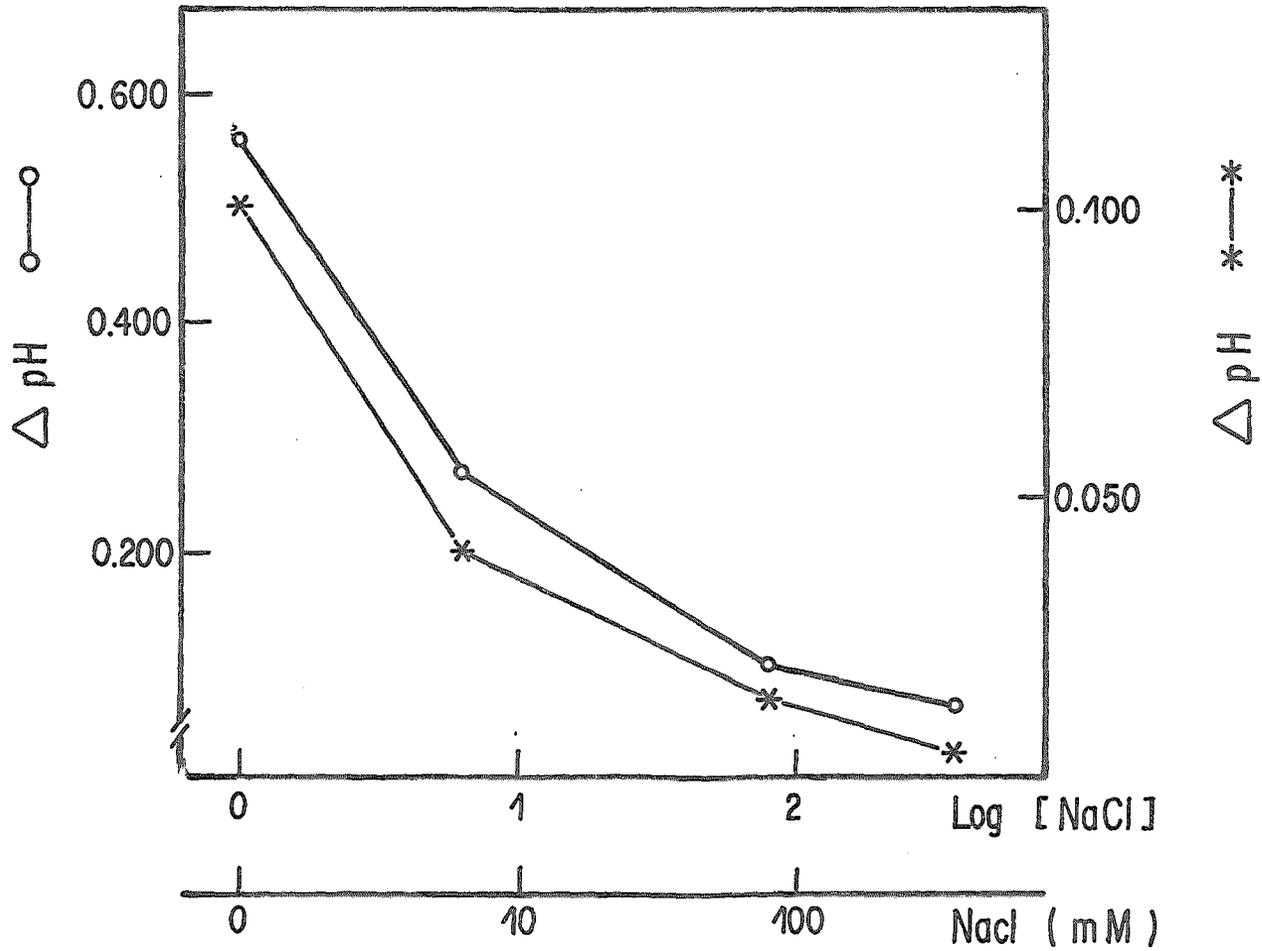


FIG. X-4

Efecto de suspensión



XI. APLICACION: ELIMINACION ACIDA DE SINAPTOSOMAS.

La tesis termina con los experimentos que se describen a continuación que ilustran la aplicación de la determinación de cambios en el pH con fines biológicos.

El objetivo de los experimentos que se muestran a continuación, es evaluar la eliminación ácida en el sistema nervioso central de mamíferos. Se utilizarán sinaptosomas (terminales nerviosas reseñadas espontáneamente), extraídos del sistema nervioso central de la rata. (Ver Cap.V secciones 6 y 7).

XI.1. Curvas estándar.

La eliminación ácida es producto del metabolismo de los sinaptosomas, los cuales durante y previamente al registro se encuentran en un medio con glucosa 10 mM, por lo que es de esperarse una eliminación constante en el tiempo. Esto impide determinar la relación cuantitativa entre los moles de protones extruídos y el pH correspondiente, en la forma de titulaciones inversas con una solución de NaOH conocida, tal y como se realiza en mitocondrias (Wenner, 1966).

Se elaboró para tal fin una curva estándar que establece un intervalo lineal hasta un pH de 0.15 unidades, ver Fig. VIII-5 con una pendiente de 0.19 unidades de pH/ μ moles adicionados. Curva que será útil para la cuantificación de protones extruídos o de un ácido orgánico, como el láctico. Se obtuvo asimismo una curva estándar en una solución con cloruro de colina en vez de sodio, ver Figura XI-1, con una pendiente similar a la anterior. En la Figura XI-2 se muestran la evaluaciones teóricas para diferentes pHs iniciales; se puede observar que hasta el intervalo de pH de 0.10 unidades, la pendiente no se modifica considerablemente, de forma que en el intervalo de un pH inicial de 7.40+/-0.05, la relación cuantitativa entre la eliminación de protones por sinaptosomas y el Δ pH, puede considerarse constante. Los experimentos, como se mencionó previamente, se realizaron por la adición de un volumen de 0.5 ml de sinaptosomas a 5.5. ml de la solución de registro (Ver Metodología). Considerando que las variaciones en el volumen adicionado, pueden ser otra causa de modificación de la curva estándar, en la Figura XI-3 se muestra la comparación de dos curvas, una de un volumen inicial de 6 ml y la otra de 6.3 ml. Se muestra la diferencia por 0.3 ml, que es un límite extremo a la variación del volumen de sinaptosomas agregados.

XI.2. Controles.

En las determinaciones de la estabilidad de la lectura durante media hora, se observó un cambio azaroso, del orden de 0.010 unidades de pH. En la Figura XI-4 se muestra la misma curva de estabilidad, que las mencionadas en el Cap. VII, Figs. VII-8 y 9 en agitación constante; se observa un incremento de los valores promedio en 15 minutos de 0.008 unidades de pH. Es decir que no hay acidificación por el CO₂ absorbido del aire. En la Figura XI-5a se muestra el control de la estabilización a la adición ácida a los 6 ml de solución en agitación máxima, con una velocidad del papel del registrador de 1.27cm/min. Se observa que la contribu-

FIG. XI-1

Curva Estándar

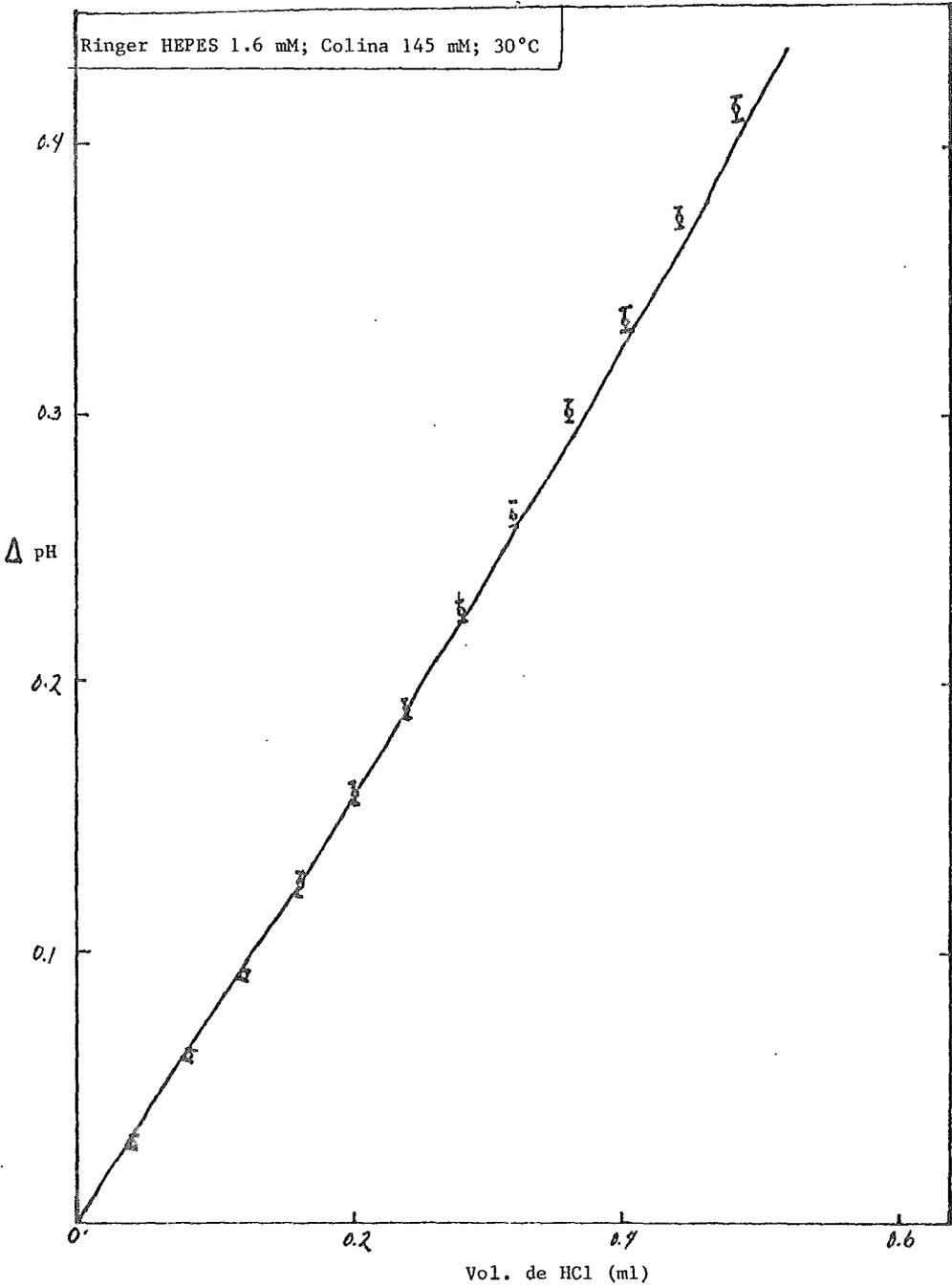
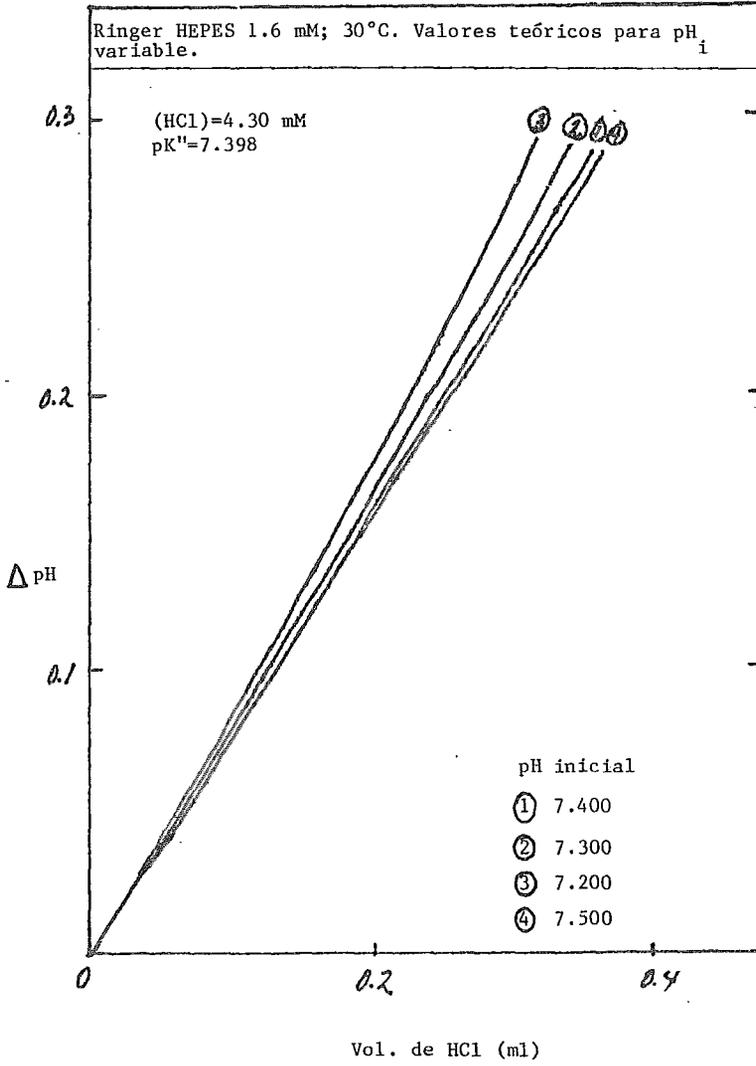


FIG. XI-2



ción a la acidificación debida al medio que baña a los sinaptosomas ocurre bastante rápidamente. Esta adición ácida es equivalente a las de la Fig. VI-3, donde se muestra que el equilibrio se alcanza en 2 segundos independientemente de la cantidad de ácido adicionado. En los cálculos de los registros con sinaptosomas se dejaron 0.2 minutos de tiempo muerto.

En todos los registros se observó una caída abrupta inicial del pH posterior a la adición de los sinaptosomas que puede atribuirse a la suma de dos factores: i) El efecto de suspensión provocado por los sinaptosomas y ii) La acidificación previa del medio externo que baña a los sinaptosomas. La primera contribución se evaluó de forma preliminar dejando primero sedimentar sinaptosomas muertos durante más de 3 horas, para enseguida introducir el electrodo y agitar los sinaptosomas. Esta agitación provocó una acidificación del orden de 0.005 pH como se observa en la Fig. 8-c.

En cuanto a la segunda alternativa, el valor promedio de la caída inicial del pH en solución de registro Ringer HEPES 1.6 mM fue de 0.058 +/-0.03 pH (n=11). En 3 registros en HEPES 5 mM se encontró una acidificación de 0.050 +/-0.027 pH. No se encontró ninguna relación entre la magnitud de la caída y la cantidad de proteína (sinaptosomas) adicionada. Tampoco se encontró una relación cuantitativa respecto a las condiciones previas de incubación. Inclusive en el registro a 0°C se puede observar la caída inicial del pH.

Si bien no se distinguieron las contribuciones respectivas mencionadas, la disminución de 0.050 en el pH inicial no altera la linealidad de la curva estándar, ver Fig. XI-2.

La cuantificación del eflujo ácido que se realizó a partir de 10 segundos después de la caída inicial del pH, se fundamenta en valores de pH más que en valores absolutos, en condiciones de fuerza iónica constante de 160 mM. El ajuste previo de pH se realizó con el estándar pH 7, I=70 mM y la pendiente con un estándar pH 10. La diferencia en las lecturas promedio del pH en fuerza iónica 160 mM, respecto al electrodo de calomel con y sin unión líquida es de 0.043 unidades más ácido el último, ver Tabla IX-5. Esta diferencia es una evaluación aproximada del error en la lectura del pH por el potencial de unión líquida a I=160 mM. Al hacer la suma de la caída abrupta más ésta última contribución, se tiene que probablemente los valores de pH inicial correctos estuvieron 0.1 unidades más ácidos que la lectura. Observando las predicciones teóricas de la curva estándar a diferentes pHs iniciales, Fig. XI-2, vemos que el error involucrado en el intervalo inicial de $\Delta pH = 0.1$, sigue siendo mínimo.

Por último la concordancia obtenida en la curva estándar, Fig. VIII-5, entre los valores experimentales de acidificación de la solución Ringer HEPES 1.6 mM y la predicción teórica elaborada utilizando un $pK' = 7.398$ (Ver Tabla IV-6), es una evidencia de que dicho pK' es válido para una solución Ringer heteroiónica y puede utilizarse en las predicciones teóricas previamente mencionadas de la Fig. XI-2.

FIG. XI-3

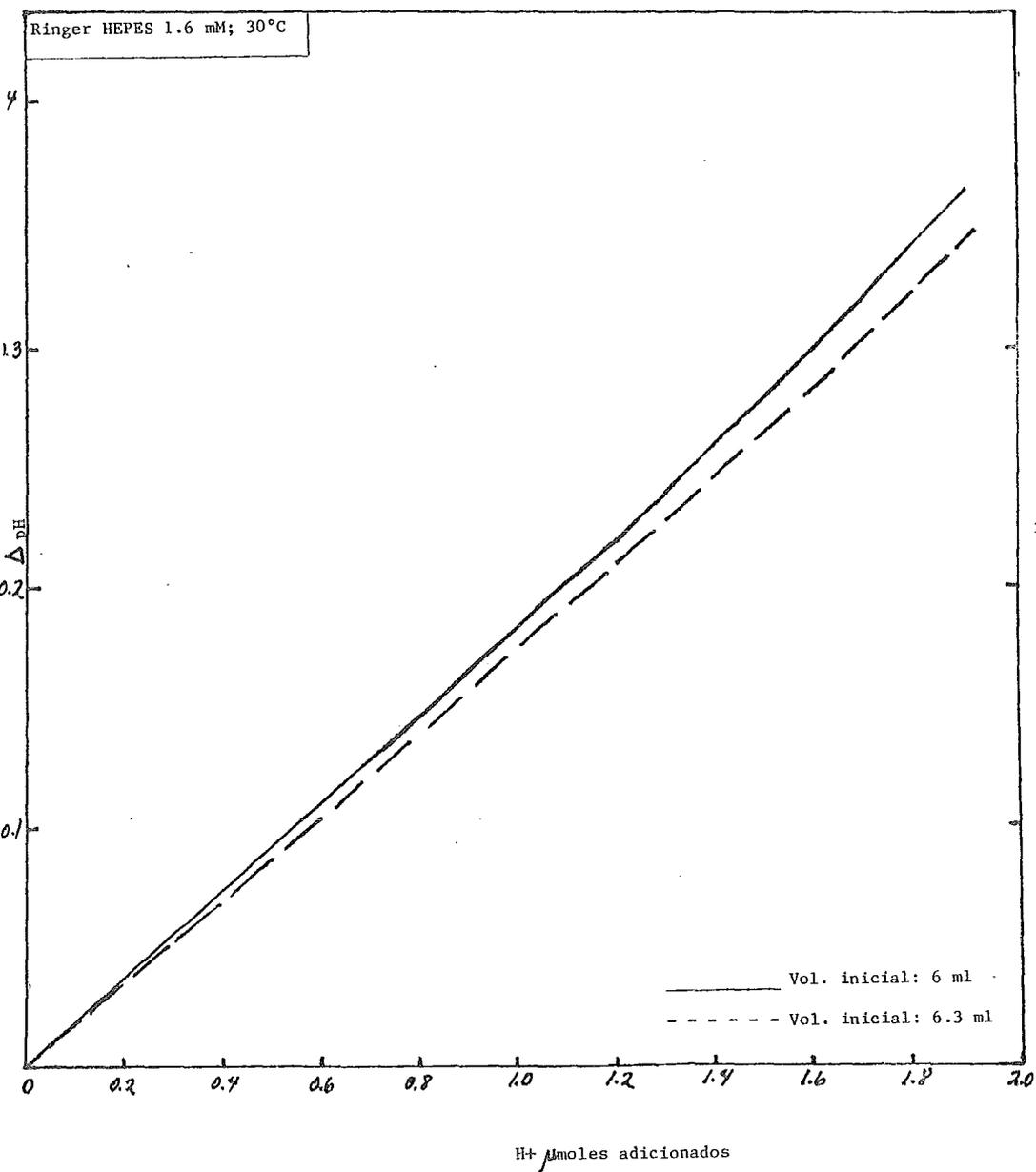
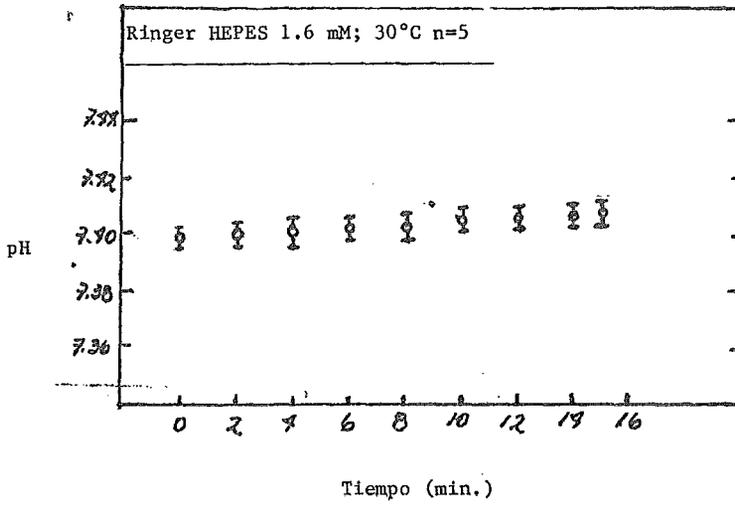


FIG. XI-4



XI-3. Eliminación ácida.

La descripción metodológica de la obtención de los sinaptosomas y de las condiciones de registro, así como la composición de las soluciones utilizadas, se encuentran en el Cap.V secciones 6 y 7.

Después de la incubación por media hora, se tomaron alícuotas de sinaptosomas que se centrifugaron dos veces, como se indicó previamente. Enseguida se resuspenden en 0.5 ml y se adicionan lo más rápidamente posible a la solución de registro. En la Figura XI-6 se muestran los promedios de las cuatro adiciones. Se observan dos pendientes, la primera rápida y la segunda más lenta.

Se realizaron determinaciones para ver el efecto de la temperatura, a 0°C, previa incubación por 15 minutos a 0°C. En la Fig. XI-5 b y c se muestran dos registros típicos en sodio 145 mM a 30 y 0°C. Esta inhibición es reversible ya que se observó nuevamente la eliminación ácida al recuperar los sinaptosomas e incubarlos a 30°C.

TABLA IX-1
EFLUJO ACIDO DE SINAPTOSOMAS EN PRESENCIA DE SODIO 145 mM.

Tiempo de registro (minutos)	n	Δ pH pH/min/mgprot.	Eflujo equivalente H+ nmoles/min/mg pro-
0.2 a 3	10	0.0026+/-0.0004	14
3 a 10	11	0.0011+/-0.0002	6

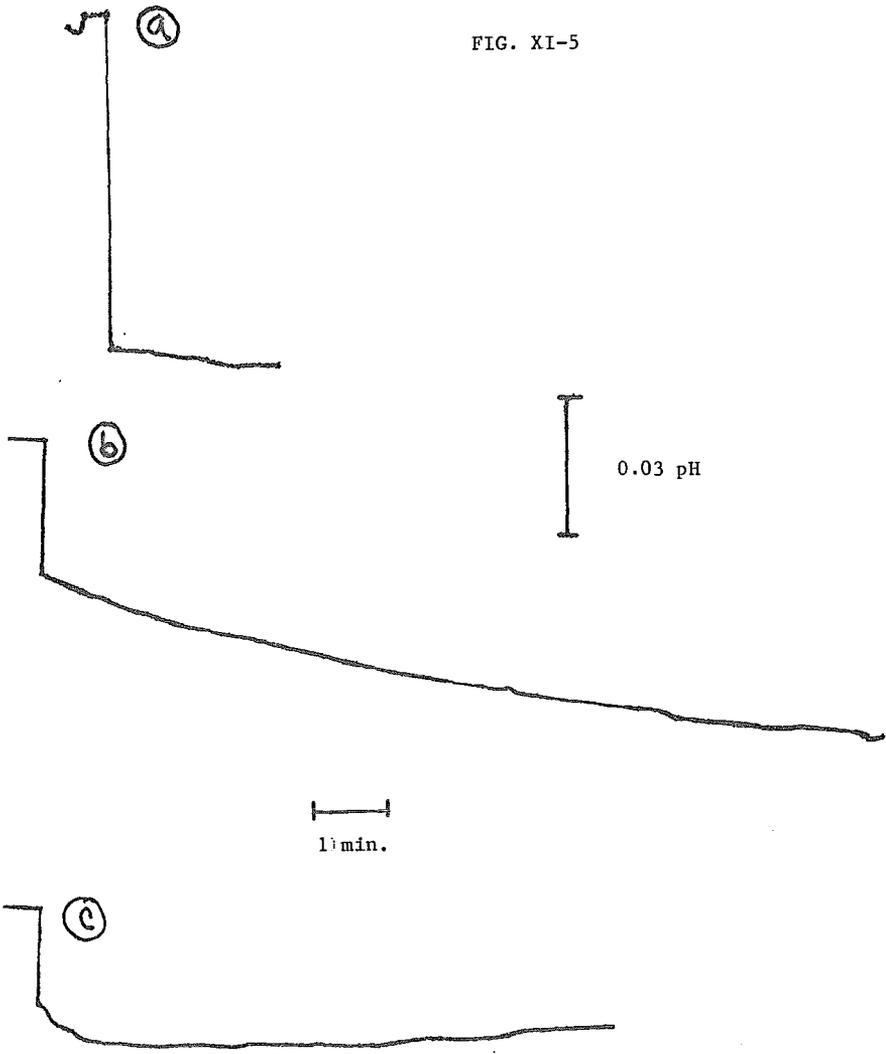
Se realizaron determinaciones en ausencia de sodio. Como ya se mencionó, hay evidencias en sinaptosomas de rata, de un cambio en el pH intracelular dependiente de sodio externo. En soluciones con cloruro de colina 145 mM, sin sodio, se obtuvieron los resultados de la Figura XI-7. No se observa una diferencia notable respecto al eflujo con sodio externo, los eflujos rápido y lento obtenidos se observan en la Tabla XI-2. Se muestra un registro en la Fig. XI-8a.

TABLA XI- 2
EFLUJO ACIDO DE SINAPTOSOMAS EN AUSENCIA DE SODIO.
(COLINA 145 mM).

Tiempo de registro (minutos)	n	Δ pH pH/min/mgprot.	Eflujo equivalente H+ nmoles/min/mg pro-
0.2 a 3	1	0.0024	13
3 a 10	1	0.0010	5

Se buscó una condición experimental en que la eliminación ácida

FIG. XI-5



- (a) Adición de ácido
- (b) Adición de sinaptosomas sodio 145 mM; 30°C
- (c) Adición de sinaptosomas sodio 145 mM; 0°C

FIG. XI-6
Registro en Sodio 145 mM (n=4)

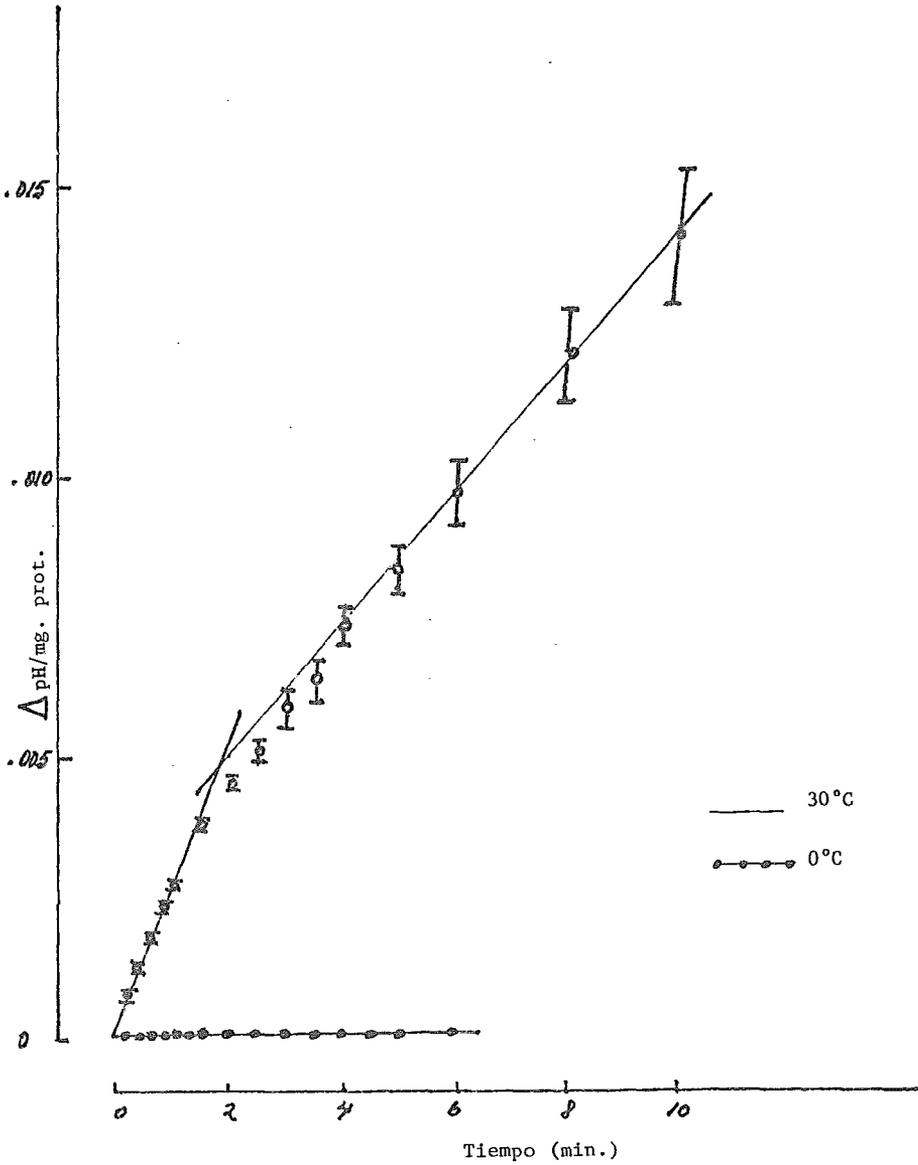
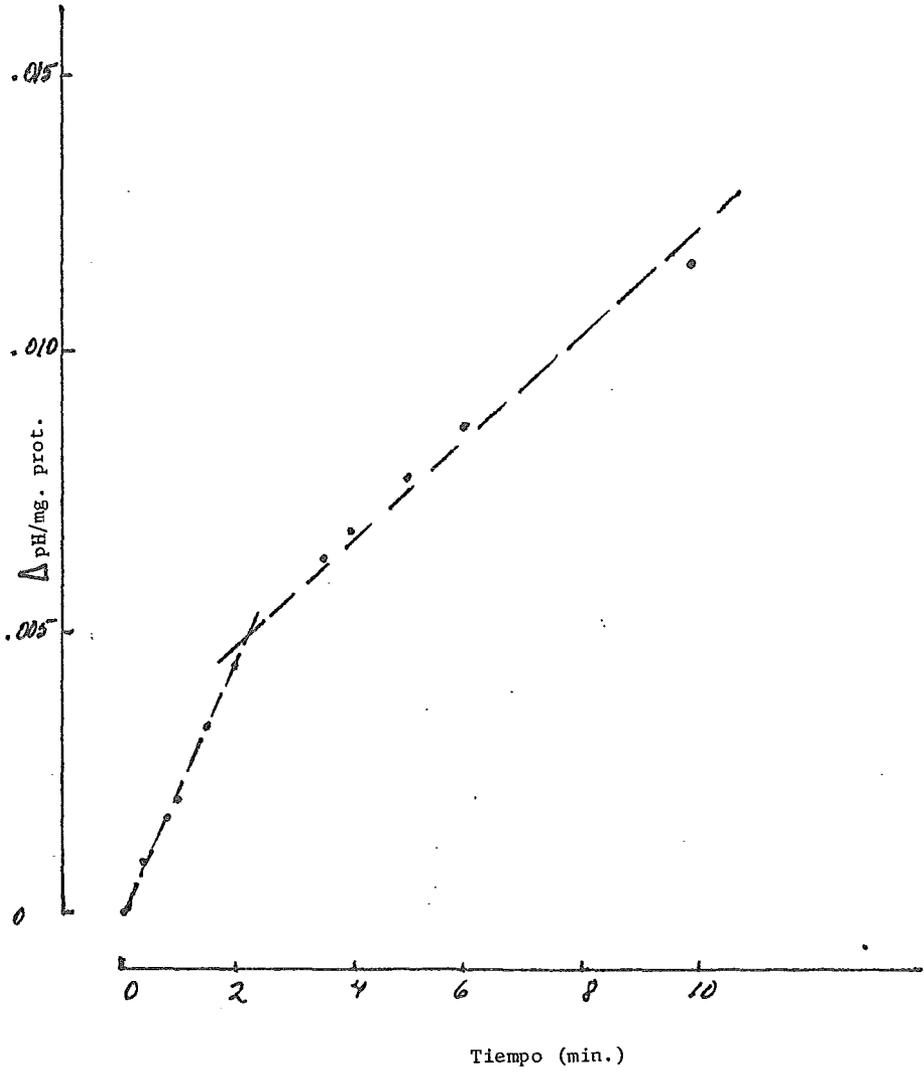


FIG. XI-7

Registro en Ringer Colina 145 mM



se viera estimulada. En la bibliografía (Boron y de Weer 1976) se describe la incubación con amonio, el cual al penetrar en la célula alcaliniza el interior y en el momento de retirarlo después de una incubación de 30 min., acidifica el interior estimulando la salida de protones.

Se incubaron sinaptosomas por 35 minutos en 25 mM NH_4Cl , enseguida se centrifugaron para lavarse en solución con sodio y se adicionaron a la solución de registro en presencia de sodio 145 mM. La acidificación se vió estimulada al inicio con una pendiente cercana al doble de la obtenida anteriormente, la pendiente lenta no se modificó. Los resultados se muestran en la Figura XI-9 y en la Tabla XI-3. Se muestra uno de los registros en la Fig. XI-8b.

TABLA XI- 3
EFLUJO ACIDO DE SINAPTOSOMAS.
PREINCUBACION CON CLORURO DE AMONIO 25 mM; 35 min.

Tiempo de registro (minutos)	n	ΔpH pH/min/mgprot.	Eflujo equivalente H^+ nmoles/min/mg pro-
0.2 a 3	1	0.0048	26
0.2 a 3	1	0.0033	18
3 a 10	1	0.0009	5

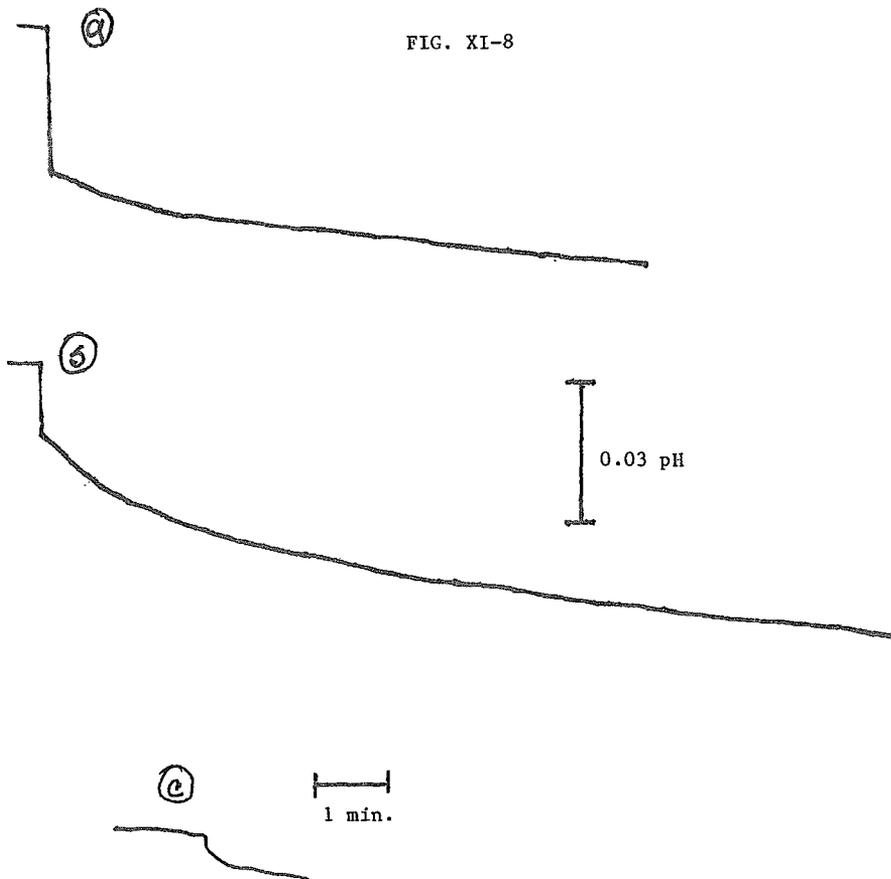
En resumen, se obtuvo una eliminación ácida en el intervalo de 10 minutos de registro, con dos fases. La primera rápida, de duración cercana a 3 minutos y la segunda más lenta de los 3 a los 10 minutos. Esta acidificación se inhibe en registros a 0°C. Únicamente al preincubar en presencia de amonio, se observó una estimulación al doble, del primer componente rápido.

Los resultados obtenidos no concuerdan con la evidencia mencionada de un cambio en el pH intracelular dependiente de sodio externo. (Comunicación personal Dr. Nachshen). Hay varias alternativas para explicar los resultados.

Una de ellas es sugerir que existe más de un mecanismo de eliminación de protones en los sinaptosomas. Un componente ocurre por el intercambio Na^+/H^+ y otro por un intercambio $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ o Cl^-/H^+ , tal y como se ha descrito en otros sistemas. (Boron W.F., de Weer P., 1976; Thomas R.C., 1976; Boron W.F. 1977).

Otra alternativa, no excluyente con la anterior, es sugerir que la acidificación del medio externo no se debe únicamente a la salida de protones. Puede haber una contribución importante de la acidificación por ácidos orgánicos productos del metabolismo anaeróbico, tal como ácido láctico o pirúvico.

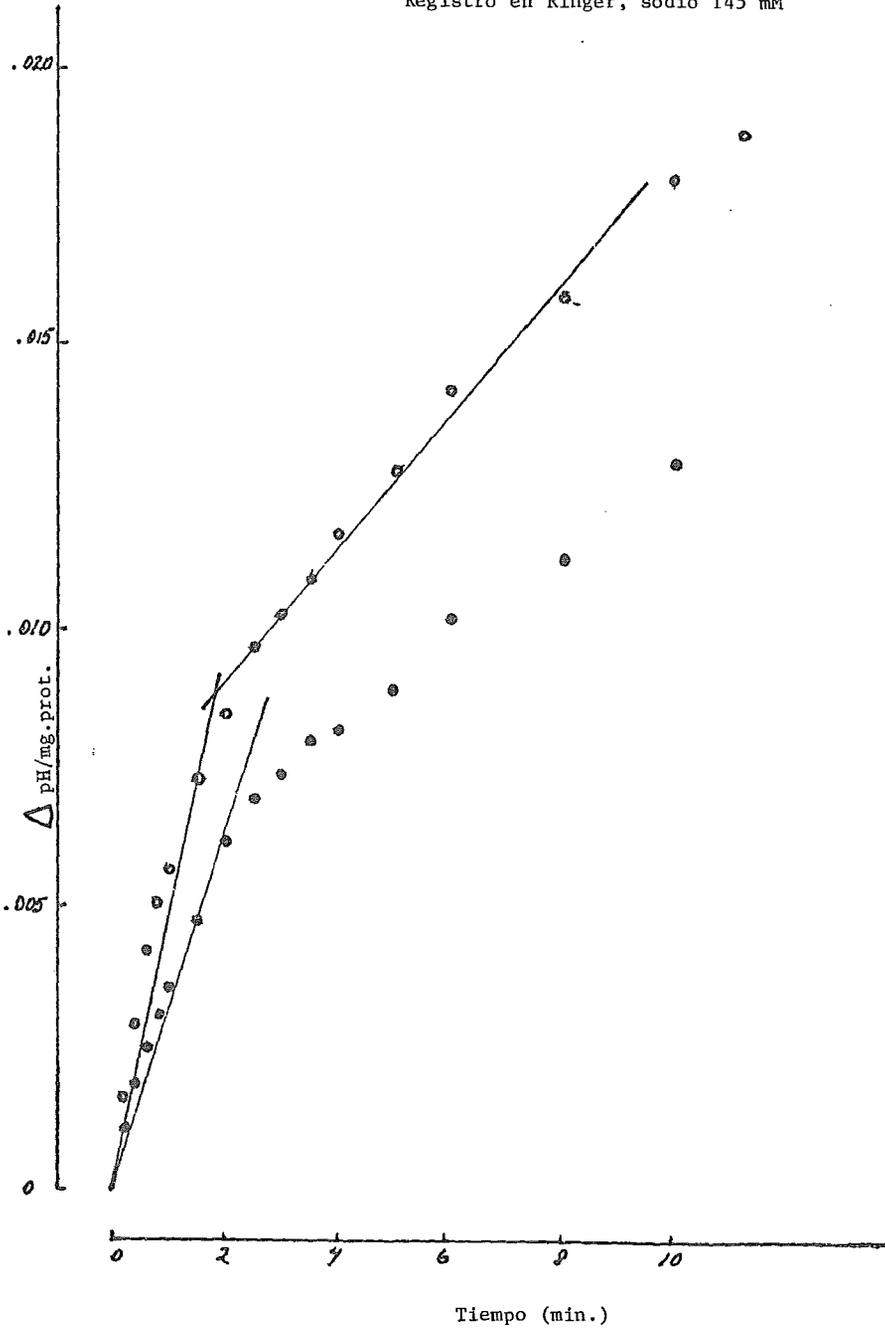
FIG. XI-8



- (a) Adición de sinaptosomas, Colina 145 mM; 30°C
- (b) Adición de sinaptosomas preincubados 35 min. en NH_4Cl 25 mM; registro en sodio 145 mM; 30°C.
- (c) Efecto de suspensión con sinaptosomas

FIG. XI-9

Preincubación con 25 mM; 35 min.
 Registro en Ringer, sodio 145 mM



XIII. CONCLUSIONES Y DISCUSION.

Como se mencionó en la introducción, en el presente trabajo se cuantificaron distintos errores provenientes de la determinación del pH con electrodo de vidrio, originados por el comportamiento de la unión líquida.

En este capítulo final haremos un resumen de los resultados obtenidos, con énfasis en la interpretación de los mismos.

Inicialmente se determinaron ciertas características indicativas del funcionamiento adecuado de los electrodos utilizados. Se determinó en el trabajo cotidiano una pendiente del electrodo de vidrio $>95\%$. Tenemos con esto un criterio adecuado del electrodo de vidrio, si bien una mejor manera de verificar la respuesta del electrodo es comparándolo directamente con el electrodo de hidrógeno (Bates y Covington, 1963) con una celda sin unión líquida :

Pt;HCl(1);Vidrio; Solución de pH; H₂(g); Pt (1)
conocido

Independientemente del pH de la solución, la diferencia de potencial debe ser cero.

Respecto al electrodo de calomel, se determinó la diferencia de potencial entre 2 electrodos de calomel, así como en curvas i-v se determinó la no polarizabilidad de los electrodos.

La resistencia de la unión líquida se determinó con un multímetro como indica Wescott (1978). Obtuvimos resultados bastante reproducibles de la resistencia, consideramos que puede ser un índice de utilidad en electrodos de plata/cloruro de plata; sobretodo en condiciones de determinación del pH en soluciones con concentración alta de proteínas o bien en electrodos con acumulación excesiva de cristales de KCl. Es un rutina fácil de realizarse y recomendable para seguir la historia del comportamiento de la unión líquida. La determinación correcta se realizó posteriormente a partir de la impedancia a alta frecuencia.

Se obtuvo un tiempo de estabilización de la respuesta a la adición ácida de 2 seg. Se tomó un tiempo muerto del registro posterior a la adición de los sinaptosomas de 10 seg..

Se obtuvo por otro lado una estabilidad de ± 0.02 pH/30 min. Para llegar a una estabilidad mayor era necesario un control más estricto de la temperatura y del aire cercano a la muestra.

Como puede verse en las figuras de los registros individuales, las variaciones de cada determinación son azarosas y no es posible predecir de antemano la dirección del cambio.

La reproducibilidad de la lectura tanto en un mismo día como en días sucesivos fue de ± 0.01 pH.

Como ya se mencionó en el capítulo del potencial de unión líquida, es bien sabido que la estabilidad y reproducibilidad de la lectura se ven afectadas por la unión líquida (Guggenheim 1930, Ferguson et al. 1932, Cumming et al. 1913, Kater et al. 1968). Se requiere una unión líquida de estructura diferente como la unión de flujo continuo o bien uniones en capilar de diámetro pequeño (Alner et al. 1967).

Las dificultades en la reproducibilidad de la lectura limitan una determinación exacta en el pH. Como se mencionó en la introducción, la convención internacional da indicaciones de la interpretación del pH en términos de la actividad de protones, únicamente para soluciones de electrolitos 1:1 con una fuerza iónica menor a 100 mM. Este es el límite máximo del tratamiento de Debye-Hückel para la evaluación del coeficiente de actividad. La lectura potenciométrica del HCl previo ajuste con estándar 2.6, determina una concentración que concuerda con la obtenida por las titulaciones de 4.3 mM. Esto resulta un tanto sorprendente ya que la fuerza iónica del estándar 2.6 es de 56 mM (Ver Cap. V) contra los 4 mM del HCl, lo cual indicaría un potencial de unión líquida residual considerable. Debido a que se desconoce la movilidad del citrato, no puede evaluarse dicho potencial residual. La única posible explicación es suponer un potencial residual pequeño a pesar de las diferentes concentraciones, compensado por la alta movilidad del H⁺. Con éste ácido se obtuvo una curva estándar de ΔH^+ vs H⁺, de pendiente 0.19pH/ μ mol de H⁺, la cual se utilizó posteriormente para la evaluación de la eliminación ácida de los sinaptosomas.

Se realizaron diversos experimentos del efecto de la fuerza iónica en la lectura del pH. Nuevamente aparece manifiesta la no reproducibilidad o estabilidad del potencial de unión, en la variabilidad de los resultados obtenidos.

Se determinó el potencial de unión líquida en función de la fuerza iónica, utilizando dos electrodos de calomel y se obtuvo un potencial que concuerda con las lecturas previas del pH en función de la fuerza iónica.

El potencial de unión líquida obtenido es mayor que el predicho por el tratamiento de Henderson. El resultado obtenido se explica cualitativamente suponiendo una unión del K⁺ al vidrio poroso. La unión del potasio al vidrio produciría una movilidad menor en la unión, lo cual produce un potencial de mayor magnitud. La magnitud del error involucrado es del orden de 0.4 unidades de pH más ácido. Este es sin duda uno de los aportes más interesantes de la tesis.

Es conveniente hacer ver que el montaje y equipo necesarios para estas observaciones, se consiguen con relativa facilidad en un laboratorio de bioquímica, aprovechando por ejemplo el electrodo de referencia de un electrodo de combinación roto. Resulta interesante mencionar que se ha elaborado un método (Wolbeis et al. 1985) de cuantificación de la fuerza iónica a partir de los efectos que provoca en el pH.

Se determinó la alteración del pH por la presencia de partículas cargadas utilizando una suspensión de resina de intercambio catiónica. Este tipo de errores han sido ya previamente señalados (Tasaki y Singer, 1963) para tomarse en consideración al determinar potenciales intracelulares. En efecto, el medio intracelular rico en proteínas -que se encuentran con carga negativa a pH neutro- puede considerarse como un polielectrolito de intercambio catiónico. En el caso de que el efecto de suspensión sea efectivamente un error en la determinación del pH, cualquier determinación de diferencia de potencial intracelular sería de difícil interpretación. Como señala drásticamente Gug-

genheim (1957): "La diferencia de potencial entre dos puntos en medios diferentes nunca puede medirse y no ha sido definido en términos de realidades físicas".

Un problema general que se ilustra en diferentes ocasiones en la tesis, es la determinación de la actividad de cualquier ión en una solución fisiológica o más aún en un medio celular, debido al desconocimiento de los coeficientes de actividad en mezclas de electrolitos y de sustancias de interés biológico desde amortiguadores hasta proteínas. Si bien desde los trabajos de Guggenheim (1955) que consideran en los coeficientes de actividad las interacciones iónicas específicas y el tratamiento más reciente de coeficientes de interacción iónica (Pitzer 1973) han logrado ampliar el intervalo de validez de Debye-Hückel; todavía resta mucho por conocer en soluciones protéicas.

En la interpretación de curvas de titulación de proteínas, Tanford (1955) hace la suposición de que "el valor de $\log H^+$ en una solución proteica es el mismo que en una solución sin la proteína con la misma fuerza iónica (utilizando en lo posible los mismos electrolitos) y el mismo pH". Si se compara esta afirmación con la previa recién mencionada de Guggenheim, nos damos una idea de la amplitud de interpretaciones posibles de un potencial electroquímico en soluciones biológicas.

Finalmente se obtuvo la cuantificación de la eliminación ácida de sinaptosomas. Se determinó un eflujo rápido equivalente a 14 nmoles/min/mg de proteína, independiente de la concentración externa de sodio, el cual se inhibe completamente a 0°C.

Si bien este resultado difiere de lo esperado en un inicio, se han encontrado evidencias de un eflujo de protones en sinaptosomas, independiente del sodio externo (Comunicación personal Dr. Sánchez-Armás).

El conocimiento de la regulación del pH intracelular cerebral puede ser de utilidad clínica a futuro para el tratamiento de la isquemia cerebral. proceso en el que intervienen varios factores como la acumulación de láctico, la disminución del pH y la entrada de iones K^+ . En efecto, hay evidencias que indican que el cerebro de mamífero (Raichle, 1983) puede ser más resistente a la isquemia de lo que anteriormente se pensaba.

XIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Alner D.J., Greczek J.J., Smeeth A.G. (1967) Precise Standard pH Values from 0 to 60°C. J. Chem. Soc. (A) 1205
2. Bard A.I., Faulkner L.R. (1980) Electrochemical Methods. (Fundamentals and Applications). John Wiley and Sons.
3. Bates, R.G. (1973) Determination of pH. Theory and Practice. John Wiley and Sons.
4. Bates R.G. (1982) pH measurements in the marine environment. Pure Appl. Chem. 54; 230-232.
5. Bates R.G., Covington A.K. (1968) Behavior of the Glass Electrode and other pH responsive electrodes in biological media. Annals of the N.Y. Acad. of Science. 148; 67-79.
6. Bates R.G., Guggenheim E.A. (1960) Pure Appl. Chem. 1; 163; ver también Bates 1973, Cap. 4.
7. Blaustein M.P., Ector A.C. (1976) . Biochem. Biophys. Acta 419; 295-308.
8. Bockris J.O.M., Reddy A.K.N. (1977) Modern Electrochemistry. Vol. 1 Plenum Rosetta.
9. Boron W.F. (1979) Active Control of Intracellular pH Respiration Physiology 33; 59-62.
10. Boron W.F. (1977) Intracellular pH Transients in Squid Giant Axons Caused by CO₂, NH₃ and Metabolic Inhibitors. The Gen. J. of Physiology 67; 91-112.
11. Boron W.F., P. de Weer (1976) Intracellular pH Transients in Giant Barnacle Muscle Fibers. The J. of General Physiology 233; C61-C73.
12. Bower V.E.; Paabo M.; Bates R.G. (1961) A standard for the measurement of the pH of blood and other physiological media. J. of Res. Nat. Bur. Std. A. Physics and Chemistry. 65-A; 267-270.
13. Brezinski D.P. (1983) Influence of Colloidal Charge on Response of pH and Reference Electrodes: The Suspension Effect. Talanta 30; 5 347-354
14. Callen H.B. (1960) Thermodynamics.
16. Christiansen T.F. (1986) The Achilles' Heel of Potentiometric Measurements, the Liquid Junction Potential. IEE Transactions on Biomedical Engineering Vol. BME-33 No. 2.
17. Covington A.K. (1981) Recent developments in the

- Standardisation and Measurement for dilute aqueous solutions. *Chim. Acta* 127;1 -21.
18. Covington A.K., Bates R.G. y Durst R.A. (1985) Definition of pH Scales, Standard Reference Values, Measurement of pH and Related Terminology (Recommendations 1984). *Pure and Appl. Chem.* 57 No.3 531-542.
 19. Cumming A.Ch. Gilchrist E. (1913) On the Potential due to liquid Contact. *Proc. Faraday Soc.* 9; 174-185.
 20. Davies, C.W. (1962) *Ion Association*; Butterworths; London.
 21. Dawson R.M.C, Daphne C., Elliot W.H., Elliot K.M. (1969). *Data for Biochemical Research*. Clarendon Press, 2nd. Ed.; Oxford.
 22. Durst E.A.; Staples B.R. (1972) Tris/Tris HCl: A Standard buffer for use in the physiological range. *Clin. Chem.* 18, 206. ver Bates (1973) *Tabla* 4.10.
 23. Eisenman George (1967) *Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations. Principles and Practice*. Marcel Dekker, Inc. N.Y.
 24. Eisenman G., Rudin D.O., Casby J.U. (1957) *Science* 126;831.
 25. Ferguson A.L., Van Lente K., Hitchens R., (1932). *Liquid Junction Potentials II. A Direct Comparison of Static and Flowing Junctions*. *J. Am. Chem. Soc.* 54; 1285-1290.
 26. Freiser H. (1978) *Ion Selective Electrodes in Analytical Chemistry. Vol. 1 Modern Analytical Chemistry. Series Editor D. Hercules*. Plenum Press. N.Y.
 27. Geddes L.A. (1972) *Electrodes and the Measurement of Bioelectric Events*. Wiley Interscience.
 28. Good N.E., Winget G.D., Winter W., Connolly T.N., Izawa S., Singh R.M.M (1966). *Biochemistry* 5 No.2; 467-477.
 29. Gram G. (1950). *Acta Chemica Scandinava* 4; 559-577.
 30. Guggenheim E.A. (1930) *A Study of Cells with Liquid-Junctions*. *J. Am. Chem. Soc.* 52; 1315-1337.
 31. Guggenheim E.A. (1957) *Thermodynamics. An Advanced treatment for Chemists and Physicists*. 3a.ed. Interscience Pub. Inc. NY.
 32. Guggenheim E.A. (1957) *Trans. Faraday Soc.* 51;747.
 33. Hajós F. (1975) *An Improved Method for the Preparation of Synaptosomal fractions in high purity*. *Brain Research*, 93; 485-489.

34. Henderson . (1907) Z. phisik. 59, 118.
35. Henderson . (1908) Z. phisik. 63, 325
36. Ives D.I., Janz G.J. (1961) Reference Electrodes, Theory and Practice. Academic Press.
36. Jenny H., Nielsen T.R., Coleman N.T., Williams D.E., (1950). Concerning the Measurement of pH, Ion Activities, and Membrane Potentials in Colloidal Systems. Science 118; 164-176.
37. Kater J.A., Leonard J.E., Matsuyama G. (1963) Junction Potential Variations in Blood pH Measurements. Annals N.Y. Academy of Sciences, 54-66
38. King E.J.(1965) Acid-Base Equilibria. The International Encyclopedia of Physical Chemistry and Chemical Physics. Topic 15 Equilibrium Properties of Electrolyte Solutions. Editor: R.A. Robinson. Vol. 4. A Pergamon Press Book, The Mac Millans Co. N.Y. 1st. Ed.
39. Krueger B.K., Ratzlaff,R.W., Strichalrz G.R., Blaustein M.P. (1979). Saxitoxin binding to synaptosomes, membranes, and solubilized binding sites from rat brain. J. of Membrane Biology 50; 287-310.
40. Kuhar J.M. (1973). Life Sciences 13; 1623-1634.
41. Lowry O.H.(1951). J. of Biol. Chem. 193;265
42. Martin A.R. (1973). J. of Neurochemistry 21; 345-356.
43. Mattock G., Band D.M. (1967) Cap.2: Interpretation of pH and Cation Measurements.del libro editado por Eisenman G.
44. Mc Ilvaine (1921) J. of Biol. Chem. 49; 183.
45. Mc Innes D.A. (1961) The Principles of Electrochemistry. Dover Publ. Inc. N.Y.
46. Meech R.W., Thomas R.C. (1977). J. of Physiology. 265; 867-879.
47. Perrin D.D. (1974). Buffers of pH and Metal Ion Control. Chapman and Hall; John Wiley and Sons.
48. Pitzer K. (1973) Thermodynamics of Electrolytes I. Theoretical Basis and General Equations. The J. of Phys. Chem. 77, No.2, 268.

49. Raichle M.E.(1983) The Pathophysiology of Brain Ischemia. *Annals of Neurology* 13(1); 2-10.
50. Ramette, Richard W. *Equilibrio y Análisis Químico*. (1983) Fondo Educativo Interamericano.
51. Robinson R.A., Stokes R.H. (1970) *Electrolyte Solutions*. 2a. Ed. 5a. Reimpresión. Butterworths; Londres.
52. Sánchez-Armáas S., Orrego F. (1977). *Life Sciences* 20; 1829-1838.
53. Sánchez-Armáas S., Orrego F. (1978) *Nauy. Schm. Arch. Pharmacol.* 302; 255-261.
54. Semple S.J.G.; Mattock G.; Uncles R. (1962). A Buffer Standard for Blood pH Measurements. *J. of Biol. Chem.* 963-967.
55. Siesjo B.K. (1973) Metabolic Control of Intracellular pH. *Scand. J. of Clin. and Lab. Inv.* 23 No. 2; 97-104.
56. Sorensen SPL., (1909) Enzymstudien:II. Uber die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bie enzymatischen Prozessen" *Biochem. Z.* 21, 131. Continuación en: (1909) 21, 201
57. Sorensen SPL., (1909) *Compt. Rend. Trav. Carlsberg*, 8, 1.
Sorensen SPL., Linderstrom-Lang K. (1924) 15, 106.
58. Staples B.R., Bates R.G. (1969) Two New Standards for the pH Scale" *J. of Research of the Nat. Bureau of Stds. Physics and Chemistry* 73A, No.1, 37-41.
59. Strain W.H.,Hershey C.O.,Mc Innes S,Breslau D.,Hershey L.A.,Mc Kinney B.M.,Varnes A.W.,Khourey Ch.J. (1984) Hazards to groundwater from acid rain. *Trace Subst. Environm. Health* 18; 178-184.
60. Tasaki I., Singer I. (1963) Some Problems Involved in Electrical Measurements okf Biological Systems. *Annals N.Y. Acad. of Sciences* 36-53.
61. Thomas R.C. (1976). Ionic Mechanisms of the H⁺ Pump in a Snail Neurone. *Nature* 262; 54-55.
62. Thomson B.M., Ressick M.A. (1981) On the Preparation of Buffer Solutions. *J. Chem. Education* 58; 9, 742-746.
63. Vojtech Fried, Uldis Blikis y Hameka Hendrik F. (1977) *Physical Chemistry*. Macmillan Publ. Co. Collier Macmillan Publ.
64. Wenner Ch.E. (1966) Association of hydrogen ion ejection

with oxidative phosphorylation by mouse liver mitochondria.
J. of Biol. Chem. 241(12) 2810-2818.

65. Wescott C.C. (1978) pH Measurements.
Academic Press.
66. Wolfbeis O.S., Offenbacher H. (1985) Analytical apparatus and
method for determining the ionic strength of an
electrochemical solution. Ger. Offen. D.E. 3,430,935 (Cl.
G01N21/64)14 Mar 85, A.T.Appl.83/3,061, 26 Aug. 83.



Q U I M I C A
D. E. P. G.