



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO EN DMSO DEL GALATO
DE PROPILO Y SU REACCIÓN CON EL ION
SUPERÓXIDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

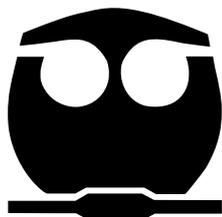
QUÍMICO

PRESENTA:

VÍCTOR HUGO GÓMEZ GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA - CD.MX.

2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. CARLOS MAURICIO CASTRO ACUÑA

VOCAL: DR. JULIO CÉSAR AGUILAR CORDERO

SECRETARIO: QFB. GLORIA GARCÍA RAMÍREZ

1er SUPLENTE: M. en C. TANIA ROJO PORTILLO

2do SUPLENTE: M. en C. ERIKA ARMENTA JAIME

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ANEXO OTE. LABORATORIO 3-C, EDIFICIO A; DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JULIO CÉSAR AGUILAR CORDERO

SUSTENTANTE:

VÍCTOR HUGO GÓMEZ GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque me permitió estudiar mi licenciatura y a toda su planta docente que me formó como profesionista.

A mis padres, Ignacio Gómez y Gabina García, porque sin ustedes esto no hubiese sido posible, estaré eternamente agradecido por todo su apoyo incondicional.

A mi hermano, Felipe de Jesús, quien me abrió camino en la vida. De ti aprendí muchas cosas, no sabes cuántos tropiezos me evitaste. Gracias por todos los consejos, apoyo y paciencia que me tuviste.

Al Dr. Julio César Aguilar Cordero, quien confió en mí y me permitió estar en su laboratorio. Gracias por todo lo que me ha enseñado y por el apoyo que me brindó para realizar este trabajo.

A los miembros del jurado por todas sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis amigos del laboratorio: Laura, Ely y Alfredo. Fueron muy buenos momentos los que compartí con ustedes.

A César, mi amigo y compañero de cuarto, por su compañía y apoyo durante la universidad en esta ciudad.

A mis amigos y amigas de la Facultad de Química, por los buenos y malos momentos que compartimos. Hicieron de esta etapa algo más ameno.

A la familia Gómez Mitra y García Torres. Gracias por todo su apoyo y cariño.

Agradezco el apoyo financiero que la Facultad de Química UNAM y la DGAPA UNAM dieron a este trabajo a través de los proyectos PAIP 5000-9031 e IN214023.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y SIGLAS	VII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO IV: MARCO TEÓRICO	5
4.1 Cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria	5
4.1.1 Complejo I (NADH-Q oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa)	7
4.1.2 Complejo II (succinato-Q reductasa)	8
4.1.3 Complejo III (Q-citocromo c oxidorreductasa o citocromo bc ₁)	8
4.1.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa)	9
4.1.5 Reducción parcial del oxígeno	10
4.2 Química del oxígeno	12
4.3 Especies reactivas de oxígeno	13
4.3.1 Ion superóxido, O ₂ ^{•-}	15
4.3.2 Formación de O ₂ ^{•-} en solventes apróticos	16
4.4 Antioxidantes	17
4.4.1 Galato de propilo	21
4.5 Actividad antioxidante	22
4.6 Métodos para determinar la actividad antioxidante	23
4.6.1 Métodos basados en la transferencia de electrón (ET)	24
4.6.2 Métodos basados en la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT)	25
4.6.3 Métodos mixtos	26
4.6.4 Métodos electroquímicos	26
4.7 Técnicas electroquímicas	27
4.7.1 Voltamperometría cíclica	31
4.7.2 Cronoamperometría	34

CAPÍTULO V: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	36
5.1 Reactivos	36
5.2 Instrumentos	36
5.3 Procedimiento experimental	36
CAPÍTULO VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Experimentos electroquímicos	39
6.1.1 Experimentos para el PG en ausencia de O ₂	40
6.1.2 Experimentos para el PG (disolución 55 mmol/L) en presencia de O ₂	42
6.1.3 Experimentos para el PG (disolución 15 mmol/L) en presencia de O ₂	43
6.1.4 Determinación del coeficiente de difusión y el número de electrones intercambiados del galato de propilo	46
6.1.5 Simulación de los resultados experimentales obtenidos en voltamperometría y cronoamperometría	49
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO	66
ANEXO A: ELECTRODO DE PSEUDO-REFERENCIA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Galato de propilo	1
Figura 4.1	Fórmulas desarrolladas de los nucleótidos	6
Figura 4.2	Esquema de la cadena de transporte de electrones	7
Figura 4.3	Rutas de formación de ROS	11
Figura 4.4	Diagrama de OM del $^3\Sigma_gO_2$	13
Figura 4.5	Reacciones sucesivas del oxígeno	14
Figura 4.6	Especies reactivas no radicales de oxígeno	14
Figura 4.7	Diagrama de OM del $O_2^{\bullet-}$	15
Figura 4.8	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio	17
Figura 4.9	Clasificación de compuestos antioxidantes fenólicos	19
Figura 4.10	Estructuras químicas de algunos antioxidantes representativos	20
Figura 4.11	Galato de propilo	21
Figura 4.12	Celda electroquímica	28
Figura 4.13	Perfiles de concentración	31
Figura 4.14	Programa de escaneo de potencial	32
Figura 4.15	Voltamperograma cíclico del superóxido	32
Figura 4.16	Ecuación de Cottrell	34
Figura 6.1	Voltamperograma cíclico del oxígeno	39
Figura 6.2	Resultados del galato de propilo en atmósfera de N_2	41
Figura 6.3	Resultados para el sistema $O_2/O_2^{\bullet-}$ a diferentes concentraciones de PG (disolución 55 mmol/L)	44
Figura 6.4	Resultados para el sistema $O_2/O_2^{\bullet-}$ a diferentes concentraciones de PG (disolución 15 mmol/L)	45
Figura 6.5	Resultados del tratamiento de Cottrell	46
Figura 6.6	Voltamperogramas cíclicos para FeMeOH y PG utilizando un ultramicroelectrodo de Pt	47
Figura 6.7	Cronoamperograma del PG usando un ultramicroelectrodo de Pt	48
Figura 6.8	Resultados de la simulación en CV	55
Figura 6.9	Resultados de la simulación en CA	56
Figura 6.10	Cronoamperogramas de doble pulso de la simulación.	57
Figura 6.11	Resultados del tratamiento de Cottrell para los cronoamperogramas simulados.	57
Figura 6.12	Perfiles de concentración simulados	58
Figura 6.13	Concentraciones superficiales simuladas	59

LISTA DE SÍMBOLOS Y SIGLAS

SÍMBOLOS

- A : Área del electrodo de trabajo
- C : Concentración de la disolución
- D : Coeficiente de difusión de la especie electroactiva
- E : Potencial del electrodo
- E° : Potencial estándar
- E'° : Potencial formal
- F : Constante de Faraday
- i : Intensidad de corriente eléctrica
- i_p : Intensidad de corriente eléctrica de pico
- n : Número de electrones intercambiados
- R : Constante universal de los gases
- v : Velocidad de barrido
- χ : Función corriente
- σ : Notación usada para la velocidad de barrido en la función corriente χ
- i_{ss} : Corriente de estado estacionario
- r : Radio del electrodo

SIGLAS

TOM	:	Teoría de orbitales moleculares
OM	:	Orbital molecular
PG	:	Galato de propilo
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
ET	:	Electrodo de trabajo
ER	:	Electrodo de referencia
CE	:	Contraelectrodo
TBAPF ₆	:	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio
CA	:	Cronoamperometría
CV	:	Voltamperometría cíclica
ROS	:	Especie reactiva de oxígeno
HAT	:	Transferencia de átomo de hidrógeno
ET	:	Transferencia de electrón

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La presencia de antioxidantes en los organismos y en los alimentos han jugado un papel fundamental para la prevención de la formación de radicales o especies oxidantes que en considerables concentraciones afectan el funcionamiento celular y pueden desencadenar múltiples enfermedades o provocar cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos.

Recientemente ha habido una oposición hacia la utilización de antioxidantes sintéticos debido a que algunos estudios realizados en animales muestran que en grandes concentraciones provocan daño hepático y carcinogénesis, por lo que existe ahora una mayor tendencia hacia la utilización de antioxidantes naturales. Sin embargo, es importante mencionar que muchos de los antioxidantes naturales no se han evaluado con la misma urgencia que los sintéticos para conocer si los daños pueden ser equivalentes. Lo cierto es que las cantidades que se utilizan son apenas representativas (0.02%) para considerarse un riesgo a la salud, por lo que la utilización de antioxidantes es más conveniente que no incluirlos en la dieta diaria o en los alimentos, debido que el beneficio que aportan es mayor que el riesgo de la formación de especies oxidantes en su ausencia (Gulcin, 2020).

Entre los antioxidantes más populares utilizados en la industria alimentaria se encuentra el galato de propilo (PG, por sus siglas en inglés), un antioxidante sintético ampliamente utilizado para conservar los alimentos y evitar su rancidez. El galato de propilo (3,4,5-trihidroxibenzoato de propilo, Figura 1.1) es un éster del ácido gálico, y sus propiedades antioxidantes están estrechamente relacionadas con los grupos hidroxilo del anillo de benceno. Además, su solubilidad en medios acuosos y no acuosos le ha dado una ventaja competitiva en el mercado.

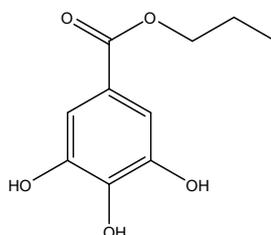


Figura 1.1. Galato de propilo o 3,4,5-trihidroxibenzoato de propilo (No. CAS: 121-79-9).

El PG al ser un antioxidante, está involucrado en procesos de transferencia de car-

ga (reacciones redox), que es una propiedad aprovechable para realizar estudios electroquímicos. La información disponible en cuanto a métodos electroquímicos para estudiar al galato de propilo es escasa, además que gran parte de ella está enfocada principalmente en medios acuosos.

Por otra parte, en medios apróticos polares es factible obtener la especie oxidante superóxido a través del oxígeno atmosférico, por medio de cronoamperometría (CA) y voltamperometría cíclica (CV). El anión radical superóxido es una de las especies oxidantes más relevantes entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), porque a partir del superóxido se forman otras ROS. Por lo tanto, la utilidad de estudiar antioxidantes en medios apróticos polares como el dimetilsulfóxido (DMSO) por CA y CV con un radical relevante como el anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$, es ayudar a entender cómo actúan estas moléculas en los organismos y alimentos en donde las condiciones de reacción puedan ser equiparables.

En este trabajo se estudia la reactividad del galato de propilo en presencia y ausencia de una especie reactiva de oxígeno ($O_2^{\bullet-}$) generada a partir del O_2 disuelto en DMSO por cronoamperometría y voltamperometría cíclica, en donde el superóxido es relativamente estable. Los experimentos en ausencia de oxígeno permiten conocer la ventana de potencial en la que el PG es electroactivo, es decir, el intervalo de potenciales donde suceden los procesos de oxidación y reducción que experimenta el PG al hacer un barrido de potencial para la transferencia electrónica desde o hacia un electrodo de carbono vítreo. En cambio, de los experimentos en presencia de oxígeno se puede electrogenerar el ion superóxido, una especie oxidante capaz de aceptar electrones de otra especie donadora como el antioxidante PG. Como consecuencia, de los voltamperogramas se pueden deducir, de manera cualitativa, las reacciones electroquímicas y químicas que pueden estar aconteciendo de acuerdo con la formación de los picos anódicos y catódicos que se producen, así también debido a las modificaciones que se presentan al ir agregando más antioxidante. Esta información será complementada con los resultados de los cronoamperogramas de doble pulso a las mismas concentraciones. Además, se utiliza un ultramicroelectrodo de platino para determinar el coeficiente de difusión y el número de electrones intercambiados del galato de propilo. Finalmente, se emplea un programa de simulación (DigiElch) para proponer el mecanismo de reacción entre el $O_2^{\bullet-}$ y el PG, de

modo que los voltamperogramas y cronoamperogramas simulados a partir de las reacciones planteadas como factibles, reproduzcan lo que se obtuvo experimentalmente. De los resultados simulados se pueden también obtener los perfiles de concentración en función de la distancia y las concentraciones superficiales en función del potencial. Los perfiles muestran los cambios de concentración de cada una de las especies involucradas conforme transcurre el experimento. Entender cómo se agotan y se forman las especies permitirá explicar lo que provoca los cambios en las corrientes de pico.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS

De manera similar a otros antioxidantes fenólicos que inhiben la peroxidación lipídica mediante el mecanismo de reacción de transferencia de protón, la reacción del galato de propilo con el radical superóxido en dimetilsulfóxido podrá llevarse a cabo mediante este mismo mecanismo, lo cual se buscará comprobar utilizando dos técnicas electroquímicas: cronoamperometría y voltamperometría cíclica.

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la reactividad del galato de propilo frente al anión radical superóxido en DMSO mediante técnicas electroquímicas y utilizar los datos obtenidos para ejecutar un programa de simulación que permita proponer un mecanismo de reacción viable de este antioxidante en medios apróticos polares.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar experimentos de voltamperometría cíclica con solo el electrolito soporte (TBAPF₆ en DMSO), para electrogenerar el ion superóxido a partir del oxígeno disuelto y de esta manera corroborar la estabilidad del radical en este medio aprótico polar.
- Realizar experimentos de voltamperometría cíclica y cronoamperometría en DMSO del galato de propilo en ausencia del radical superóxido para conocer su electroactividad, el número de electrones intercambiados y su coeficiente de difusión.
- Realizar experimentos de voltamperometría cíclica y cronoamperometría en DMSO del galato de propilo frente al radical superóxido para estudiar su reactividad.
- Utilizar el programa de simulación Digielch y los datos experimentales para proponer un mecanismo de reacción viable de este antioxidante en DMSO.

CAPÍTULO IV: MARCO TEÓRICO

4.1 Cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria

El transcurso de la vida tal y como la conocemos se basa en una serie de reacciones de transferencia electrónica que aprovechan la energía disponible en los alimentos para poder obtener energía química en forma de ATP (adenosín trifosfato, [Figura 4.1a](#)). Este proceso está descrito por la cadena de transporte de electrones, la cual consiste en una transferencia de electrones desde las biomoléculas provenientes de procesos catabólicos como el NADH (nicotinamida adenina dinucleótido, [Figura 4.1b](#)) y FADH_2 (flavín adenín dinucleótido, [Figura 4.1c](#)) hacia una serie de complejos (I, II, III y IV) que se encuentran embebidos en la membrana interna de la mitocondria. El complejo IV o citocromo c oxidasa, es el encargado de transferir cuatro electrones a una molécula de oxígeno, que junto con cuatro protones provenientes de la matriz mitocondrial formarán dos moléculas de agua en el proceso global. Durante esta transferencia electrónica, en los complejos I y III también se lleva a cabo el transporte de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, lo que produce un gradiente de protones y a su vez un gradiente electroquímico (por un exceso y deficiencia de protones en ambos lados de la membrana interna) conocido como fuerza protón-motriz ([Feduchi et al., 2021](#); [Voet et al., 2016](#)).

De acuerdo con la teoría quimiosmótica de acoplamiento propuesta por Peter Mitchell en 1961, el gradiente electroquímico lo aprovecha la ATP sintasa (complejo V) para sintetizar ATP, estableciéndose un acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP o fosforilación oxidativa ([Feduchi et al., 2021](#)).

La fuerza termodinámica que origina el movimiento de los electrones a través de los complejos, son los potenciales de reducción (mostrados en la [Figura 4.2](#)) de los pares redox de las especies involucradas en la cadena respiratoria. Es por eso que una especie fuertemente reductora como el NADH dona sus electrones a la ubiquinona, un transportador móvil entre el complejo I y III. Por lo tanto, conforme se incrementa el potencial de reducción, habrá mayor afinidad de cada complejo por

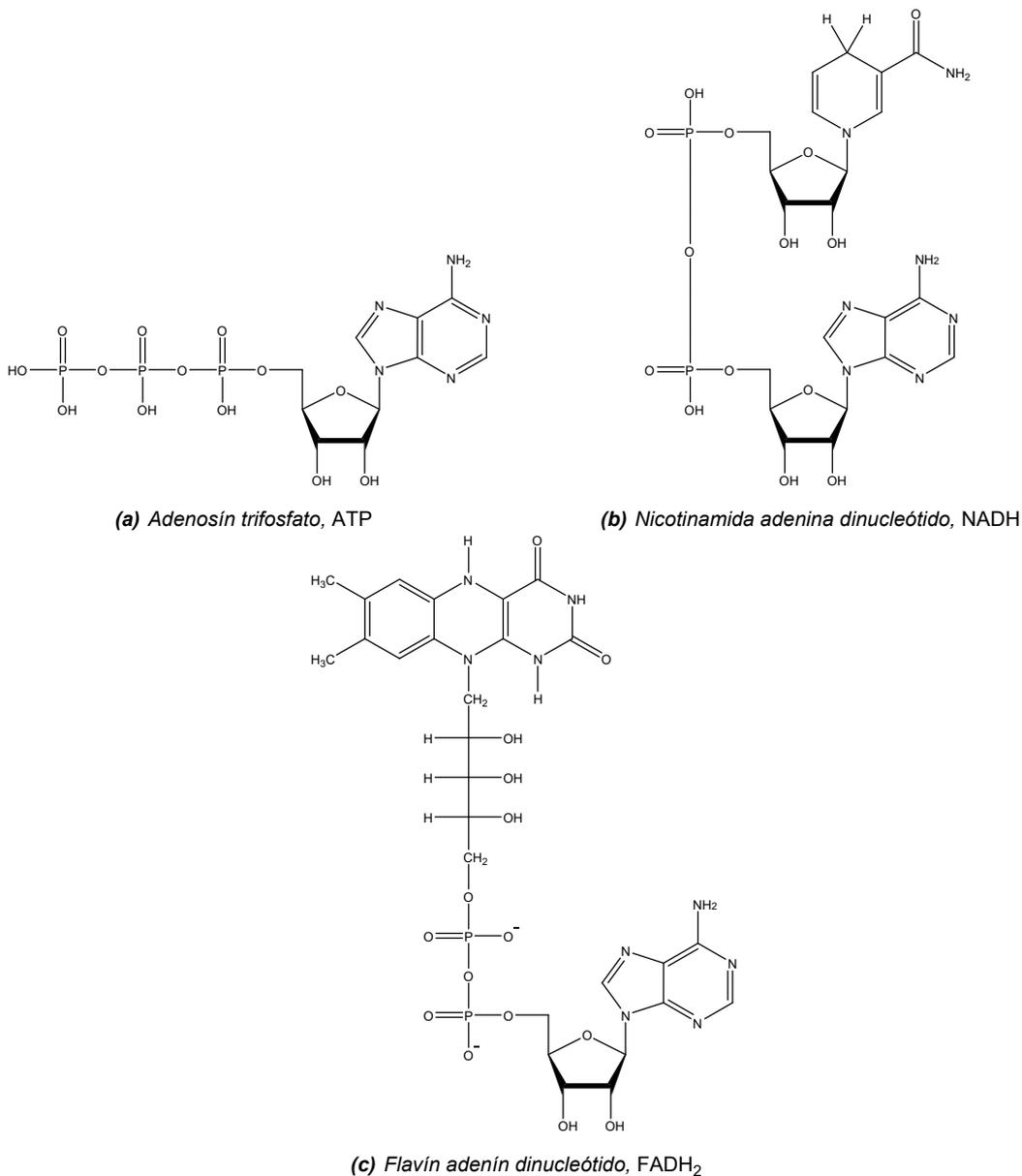


Figura 4.1. Fórmulas desarrolladas de los nucleótidos que participan en la cadena de transporte de electrones.

los electrones, que en términos de energía libre de Gibbs (ΔG) produce una disminución, mostrando una tendencia hacia un estado de mínima energía. La ecuación que relaciona el cambio de la energía libre de Gibbs (ΔG) con la diferencia de potencial (ΔE) de las semirreacciones es:

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad (4.1)$$

En condiciones estándar la ecuación anterior se escribe:

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ} \quad (4.2)$$

donde ΔE° es igual a la diferencia de potenciales estándar de reducción.

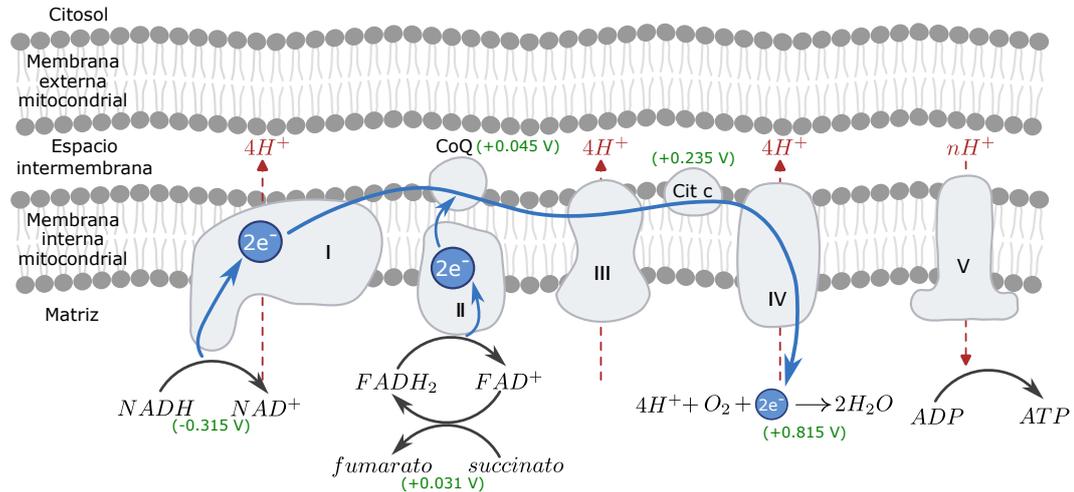
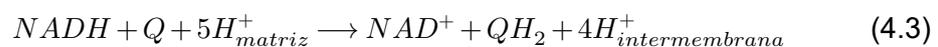


Figura 4.2. Esquema representativo de la cadena de transporte de electrones. Las coenzimas NADH y FADH₂ ceden sus electrones a los complejos localizados en la membrana interna de la mitocondria, los cuales siguen la ruta señalada por las flechas azules debido a las diferencias de los potenciales de reducción (marcados en verde) de las reacciones involucradas, hasta terminar en la reducción del oxígeno a agua. Como se puede observar, los potenciales van aumentando entre cada uno de los complejos, lo que significa que hay una creciente afinidad por los electrones. Las flechas punteadas en rojo muestran la transferencia de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana durante las reacciones en los complejos. En el complejo V la ATP sintasa utiliza el gradiente electroquímico generado apartir de los pasos anteriores para la síntesis del ATP. Los valores de los potenciales estándar de reducción fueron tomados de Voet et al. (2016). Figura realizada con base en Yin y O'Neill (2021).

4.1.1 Complejo I (NADH-Q oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa)

En esta primera etapa de la cadena respiratoria el Complejo I, también llamado NADH-Q oxido reductasa, transfiere los electrones provenientes del NADH a la ubiquinona o coenzima Q en su forma oxidada (Q) a través de una serie de grupos prostéticos como la flavina mononucleótido (FMN) y complejos hierro-azufre del tipo [2Fe-2S] y [4Fe-4S] (Voet et al., 2016). La siguiente reacción describe esta etapa (Berg et al., 2015):



Como se puede observar cuatro protones son transportados desde la matriz mito-

condrial hacia el espacio intermembrana. La forma reducida de la coenzima Q se conoce como ubiquinol (QH₂), una hidroquinona con dos protones y dos electrones más que la quinona de partida.

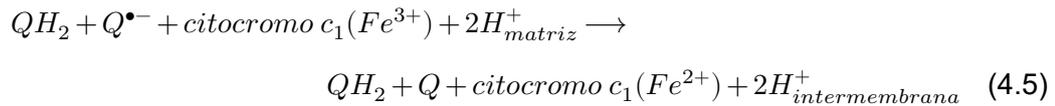
4.1.2 Complejo II (succinato-Q reductasa)

El Complejo II o succinato-Q reductasa contiene a la enzima succinato deshidrogenasa, una enzima del ciclo de Krebs, la cual genera FADH₂ a partir de FAD⁺ debido a la oxidación del succinato a fumarato. Los electrones del FADH₂ pasan de igual manera que en el complejo I a la ubiquinona a través de diferentes grupos prostéticos Fe-S para formar ubiquinol. La relativamente baja energía libre obtenida a partir de la transferencia de dos electrones del FADH₂ a Q es insuficiente para la síntesis de ATP y por lo tanto para el paso de protones desde la matriz hacia el exterior. Esto último es lo que diferencia al complejo II del I, III y IV, además que muestra la no secuencia entre I y II, sin embargo, sus electrones siguen la misma trayectoria hacia III por medio del ubiquinol (Voet et al., 2016).

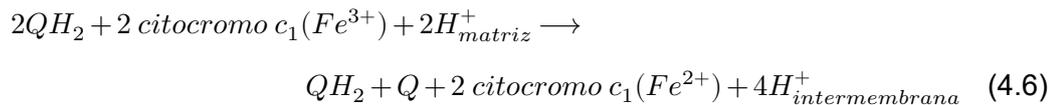
4.1.3 Complejo III (Q-citocromo c oxidorreductasa o citocromo bc₁)

La función de este complejo es acoplar la transferencia de electrones provenientes del complejo I y II en forma de QH₂ hacia el citocromo c. Esta última enzima contiene dos citocromos del tipo b (b_L y b_H), un citocromo c₁ y un complejo Fe-S de tipo [2S-2Fe] conocido como centro de Reiske, con los cuales a través del ciclo Q, cuatro protones pasan al espacio intermembrana desde la matriz mitocondrial. Durante el ciclo, QH₂, un transportador de dos electrones reduce a dos moléculas de citocromo c₁, un transportador de un solo electrón, en un proceso dividido en dos etapas. En la primera etapa una primer molécula de QH₂ se oxida a Q^{•-} (Ecuación 4.4) y en la segunda etapa una segunda molécula de QH₂ reduce al Q^{•-} recién formado que junto con dos protones provenientes de la matriz forman una molécula de Q y otra de QH₂ (Ecuación 4.5)(Berg et al., 2015; Voet et al., 2016).

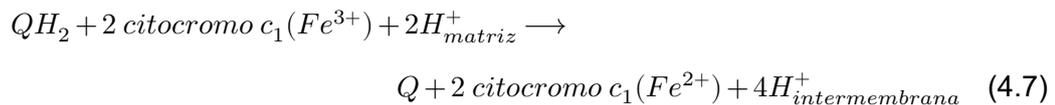




Por lo que en el proceso global dos moléculas de QH_2 transfieren dos electrones al citocromo c_1 de forma consecutiva y contribuyen al gradiente de protones con el paso de cuatro iones H^+ hacia el lado citosólico:



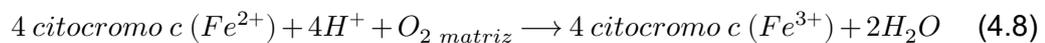
Equivalente a:



Finalmente, los electrones provenientes de las moléculas de citocromo c_1 se transfieren al citocromo c , quien los transportará al cuarto y último complejo, complejo IV.

4.1.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa)

En la última etapa el complejo IV o citocromo c oxidasa cataliza la reacción entre el citocromo c y el oxígeno para formar dos moléculas de agua de acuerdo con la siguiente reacción:

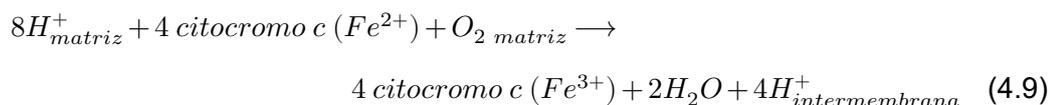


Como se puede observar en este proceso se requieren de cuatro electrones, es decir, cuatro moléculas de citocromo c.

La citocromo c oxidasa está constituida por dos grupos hemo de tipo A (citocromo a y citocromo a_3) y dos centros con tres iones de cobre. En un centro están dos iones cobre unidos por dos residuos de histidina, identificados como Cu_A/Cu_A y en

el otro centro, Cu_B, un átomo de cobre está coordinado a tres residuos de histidina (Hys 240, Hys 290 e Hys 291) en la que la histidina 240 a su vez está formando un enlace covalente con un residuo de tirosina (Tyr 244) (Berg et al., 2015; Voet et al., 2016).

El flujo de electrones a través del complejo IV pasa primeramente al centro Cu_A/Cu_A, en seguida al citocromo a, después al citocromo a₃ y por último al centro Cu_B. Debido a la proximidad espacial entre el citocromo a₃ y el centro Cu_B, estos dos complejos forman un solo complejo binuclear a₃ – Cu_B, donde se lleva a cabo la reducción de oxígeno a agua. La energía libre obtenida de la reducción la aprovecha la citocromo c oxidasa para transferir cuatro protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana por lo que en el proceso global son ocho la cantidad de protones que se retiran de la matriz mitocondrial, cuatro forman parte de las dos moléculas de agua y los otros cuatro pasan al espacio intermembrana (Berg et al., 2015; Voet et al., 2016):



4.1.5 Reducción parcial del oxígeno

La reducción de oxígeno a agua en la citocromo c oxidasa es precisa y eficiente; sin embargo, en algunas ocasiones suceden reducciones incompletas, produciendo radicales libres como el anión radical superóxido o el radical peroxilo, especies muy inestables y por lo tanto reactivas, que provocan un daño oxidativo en el ADN como en las biomoléculas si se acumulan y no se eliminan a tiempo (Figura 4.3). Los radicales libres pueden reaccionar con diferentes especies presentes en el ambiente celular para producir nuevos radicales y propagarse por toda la célula en un proceso de peroxidación lipídica, lo que desencadena múltiples padecimientos y enfermedades. Lo mismo puede ocurrir en los complejos I, II y III, posiblemente por una fuga de electrones (Berg et al., 2015; Feduchi et al., 2021).

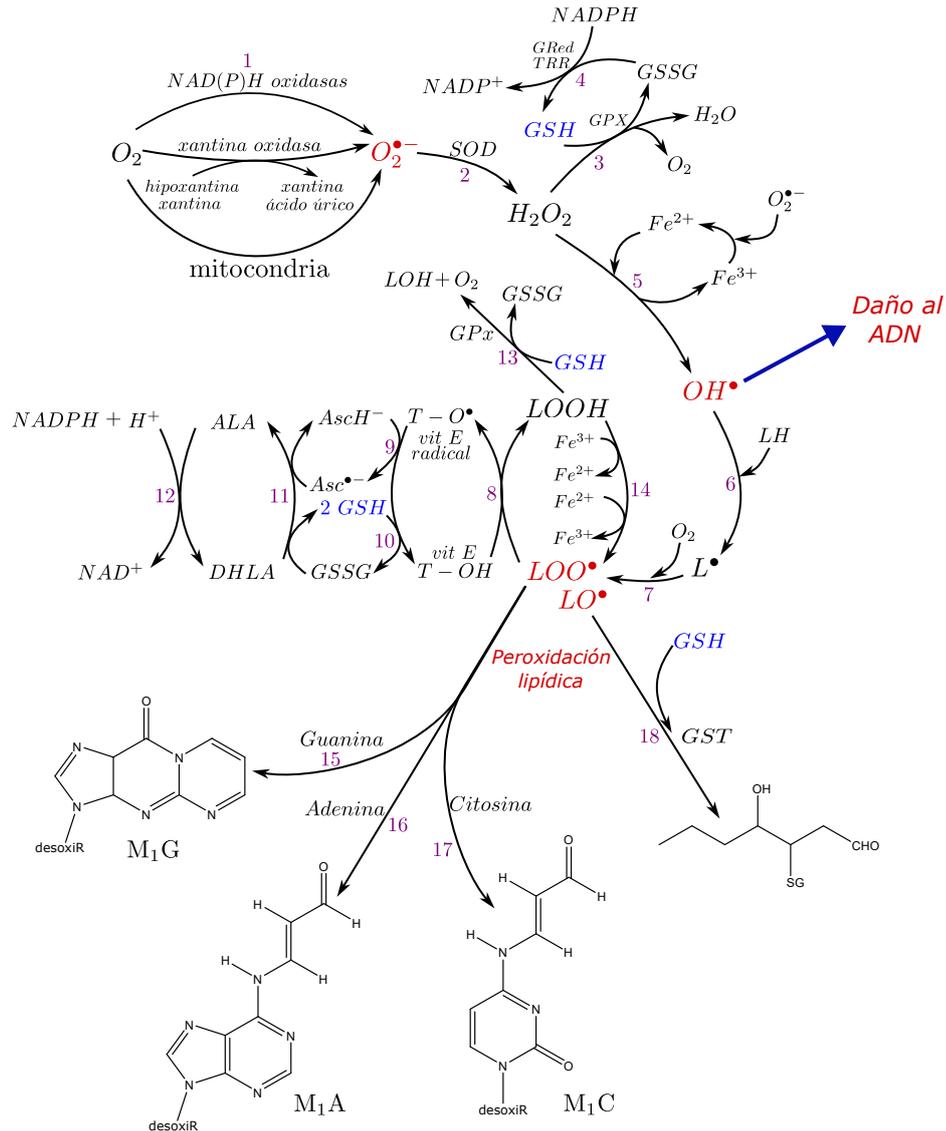
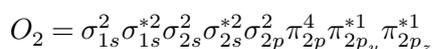


Figura 4.3. Rutas de formación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y daño al ADN. (1) Producción del ion superóxido por medio de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y a través de la enzima xantina oxidasa o las NAD(P)H oxidasas. (2) Dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2 catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). (3) Eliminación del H_2O_2 por catálisis de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) con glutatión (GSH) formando glutatión disulfuro (GSSG). (4) Reducción del glutatión oxidado (GSSG) para formar nuevamente GSH con ayuda de la enzima glutatión reductasa (GRed) utilizando NADPH. (5) Reacción de Fenton catalizada por hierro(II) con producción de radicales hidroxilo (OH^{\bullet}). (6) La reacción del radical OH^{\bullet} con ácidos grasos poliinsaturados genera radicales lipídicos (L^{\bullet}). (7) La subsecuente reacción con oxígeno molecular forma radicales peroxilo (LOO^{\bullet}). (8) Reducción del radical peroxilo (LOO^{\bullet}) a hidroperóxido lipídico (ROOH) con la oxidación de la vitamina E al radical TO^{\bullet} . (9) Regeneración de la vitamina E con oxidación del ácido semidihidroascobato ($AscH^-$) a radical ascorbilo ($Asc^{\bullet-}$). (10) Reacción alternativa para la reducción del radical TO^{\bullet} a TOH empleando glutatión. (11) El ácido dihidrolipoico (DHLA) se convierte en ácido alfa-lipoico (ALA) y dona su electrón para volver a formar $AscH^-$ y GSH. (12) Una molécula de NADPH reacciona con ALA y produce DHLA junto con NAD^+ . (13) La enzima GPx forma alcoholes y oxígeno molecular a partir de radicales peroxilo y glutatión. (14) Los iones $Fe(II)$ y $Fe(III)$ descomponen los hidroperóxidos lipídicos a radicales alcoxilo y peroxilo. El producto principal de la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA) el cual es mutagénico y puede interaccionar con las bases nitrogenadas del ADN como guanina, adenina y citosina, formando los aductos M_1G , M_1A y M_1C , reacciones (15), (16) y (17), respectivamente. (18) La peroxidación lipídica forma 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) que reacciona con GSH y forma un aducto. Figura realizada con base en Valko et al. (2007).

4.2 Química del oxígeno

Para los organismos aerobios el oxígeno (O_2) es un elemento imprescindible para la vida, tanto que, a pesar de ser un gas mutagénico tóxico, queda en duda cómo es que los animales y seres humanos lo necesitan para la producción de energía en la mitocondria (Halliwell y Gutteridge, 2015). Esto tiene que ver en gran parte al cambio a través del tiempo en las condiciones atmosféricas del planeta, además de la evolución de los organismos y la adaptación de estos a ambientes ricos en oxígeno, teniendo que reasignar a sus moléculas a nuevas funciones o bien desarrollando defensas antioxidantes para sobrevivir. En algunos casos la adaptación fue tan satisfactoria que incluyeron al oxígeno en su metabolismo, como podemos ser testigos hoy en día; otros tuvieron que morir, y en algunos más su crecimiento se inhibió (organismos anaerobios). Si bien las condiciones actuales en el porcentaje de oxígeno atmosférico (21 %) siguen siendo dañinas, los organismos complejos multicelulares de nuestra era no están expuestos totalmente a estos niveles debido a que la presión de oxígeno en la sangre es más baja que la del aire (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Desde el punto de vista de la teoría de orbitales moleculares (TOM), el dióxígeno (O_2), es un biradical, con dos electrones desapareados en los orbitales moleculares (OM) de antienlace (*) tipo π (Figura 4.4). Esta molécula contiene dieciséis electrones, cuatro de los cuales ocupan los orbitales σ_{1s} y σ_{1s}^* , cuatro más se encuentran en los orbitales σ_{2s} y σ_{2s}^* . Los ocho restantes se distribuyen en tres OM de enlace (dos tipo σ y uno tipo π) y dos OM de antienlace tipo π ($\pi_{2p_y}^*$, $\pi_{2p_z}^*$). La configuración electrónica para la molécula de oxígeno queda de la siguiente manera (Huheey et al., 1997):



La razón por la cual los dos últimos electrones ingresan a diferentes orbitales π^* se debe a la doble degeneración de este orbital y a la regla de máxima multiplicidad de Hund, lo que le concede su propiedad paramagnética.

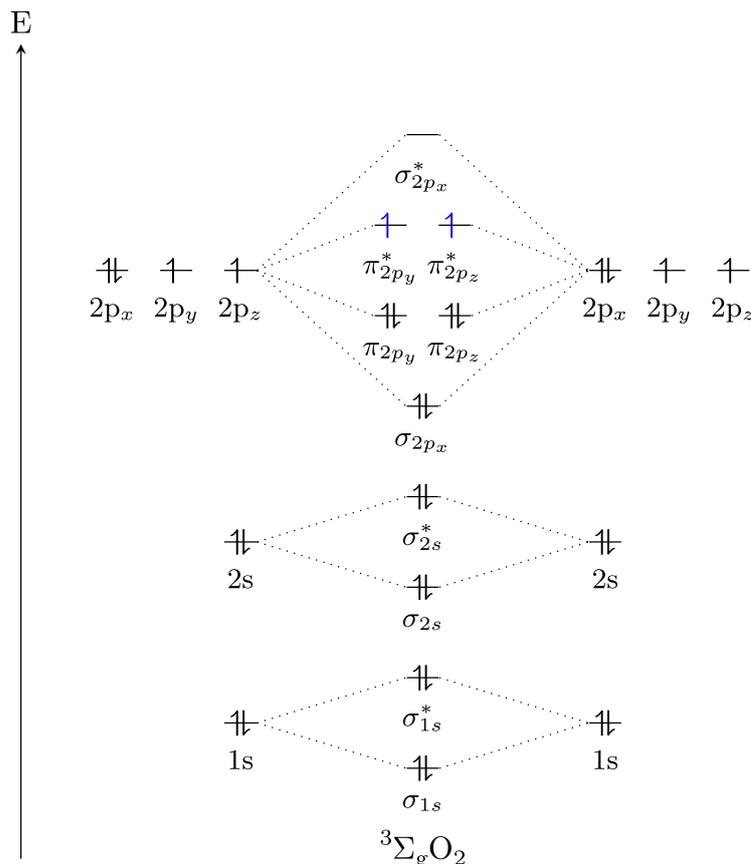


Figura 4.4. Diagrama de orbitales moleculares para el oxígeno triplete ${}^3\Sigma_g\text{O}_2$ ($2S + 1 = 3$, donde S es la suma de los valores de los números cuánticos de espín o es el momento angular de espín total), esta configuración es la más estable y es la forma en la que se encuentra el oxígeno en el aire. Debido a que presenta dos espines paralelos el oxígeno reacciona escasamente con los no radicales porque las moléculas o átomos tienen electrones apareados en su orbital de más alta energía, esta restricción permite al oxígeno aceptar un electrón a la vez y explica su alta reactividad con otros radicales. Figura realizada con base en [Huheey et al. \(1997\)](#) y [Halliwell \(2006\)](#).

4.3 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno, también conocidas como ROS, son especies que por su naturaleza redox pueden reaccionar fácilmente con los componentes celulares, oxidándolos y por lo tanto interrumpiendo su funcionamiento. Un mal funcionamiento de las biomoléculas presentes en el organismo conlleva al desarrollo de múltiples enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, neurológicas, inflamatorias, infecciosas, así como el cáncer ([Brieger et al., 2012](#); [Finkel y Holbrook, 2000](#); [Pisoschi y Pop, 2015](#); [Valko et al., 2007](#)).

Entre las ROS más estudiadas se encuentran el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo, los radicales peróxilo, los radicales alcoxilo, el peróxido de hidrógeno y los oxígenos singuletes (${}^1\Delta_g\text{O}_2$ y ${}^1\Sigma_g\text{O}_2$). La mayoría de ellas son radicales li-

bres como los identifica su nombre y aunque el peróxido de hidrógeno o el oxígeno singulete ($^1\Delta_g O_2$) no son radicales libres (Figura 4.6) también son reactivos y participan en la formación de más radicales libres, por ejemplo, la reacción de Fenton (Ecuación 4.10) y la de Haber-Weis (Ecuación 4.13).

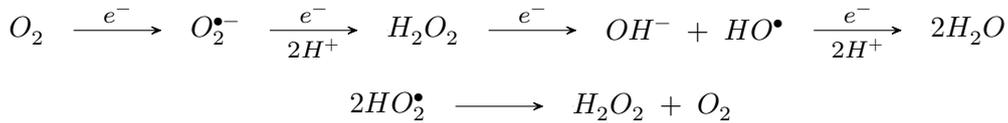
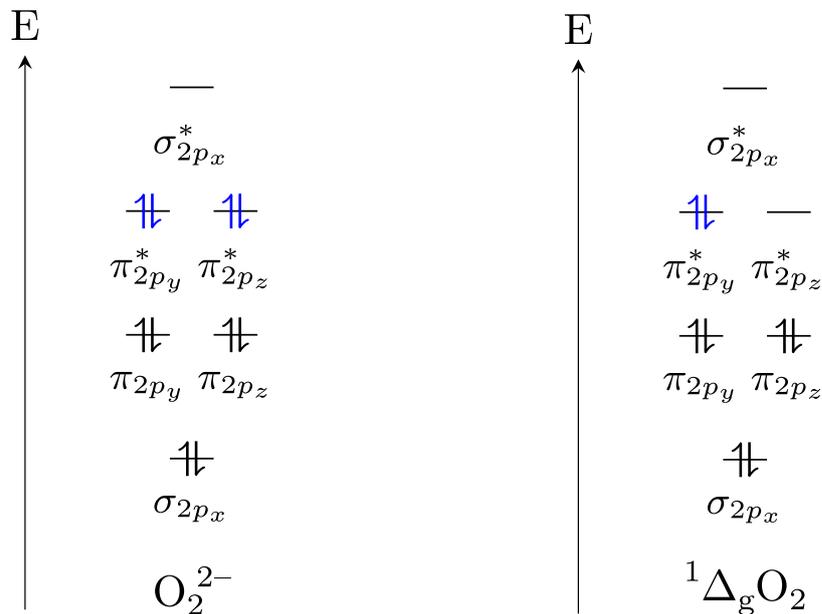


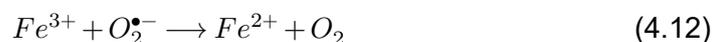
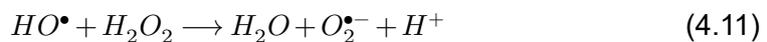
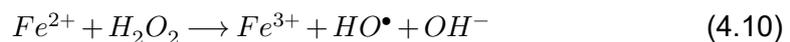
Figura 4.5. La reducción monoeléctrica del oxígeno (O_2) produce el anion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$). El ion superóxido puede reducirse sucesivamente hasta formar agua, o bien puede dismutar tras protonarse, formando peróxido de hidrógeno y oxígeno. Figura realizada con base en Nordberg y Arnér (2001).

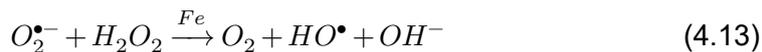


(a) Diagrama de OM del ion peróxido O_2^{2-} , una ROS no radical e isoelectrónica al peróxido de hidrógeno. Sus orbitales π de antienlace se encuentran completamente ocupados (diamagnético) y presenta una relativa estabilidad en ausencia de iones metálicos comparada con otras ROS en sistemas biológicos.

(b) Diagrama de OM del oxígeno singulete $^1\Delta_g O_2$ ($2S+1=1$). En el estado $^1\Delta_g$ una diferencia de energía respecto al estado basal del oxígeno, oxígeno triplete, ha removido la restricción del espín, permitiendo su apareamiento en un solo orbital π de antienlace y dejando el otro orbital vacío. Debido a esto es también un no radical.

Figura 4.6. Especies no radicales de oxígeno.





Como se observa, la reacción de Haber-Weiss es una reacción de descomposición del H_2O_2 catalizada por hierro (puede ser también cobre). La suma de la reacción de Fenton y la reducción de Fe^{3+} por el superóxido (Ecuación 4.12) explican esta reacción.

4.3.1 Ion superóxido, $O_2^{\bullet-}$

El anión radical superóxido, también conocido como hiperóxido, resulta de la reducción monoeléctrica de dioxígeno (Ecuación 4.14). Posee un electrón desapareado en uno de sus orbitales de antienlace (Figura 4.7), provocando una disminución en el orden de enlace respecto al dioxígeno y un aumento en su reactividad, la cual también dependerá del disolvente en que se encuentre, el pH y la temperatura. Por ejemplo, en medios ácidos acuosos el $O_2^{\bullet-}$ tiene una vida media muy corta debido a su protonación (Ecuación 4.15) y posterior dismutación (Ecuación 4.16).

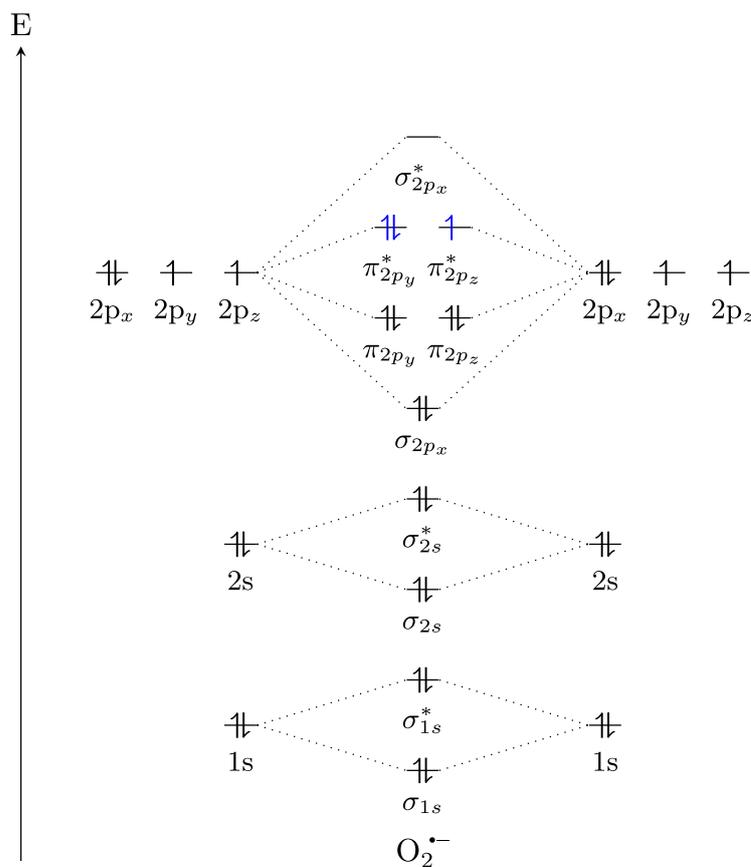
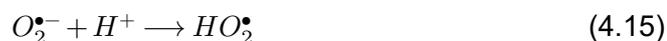
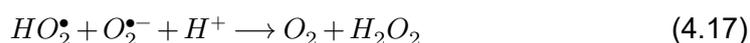


Figura 4.7. Diagrama de orbitales moleculares del superóxido $O_2^{\bullet-}$ ($2S+1 = 2$).



Así también y más rápida con otra molécula de superóxido, [Ecuación 4.17](#):



La formación del anión radical superóxido por métodos electroquímicos como la voltamperometría cíclica y con electrodos de disco giratorio en estos medios, genera voltamperogramas que describen un proceso electroquímico irreversible. Por lo tanto, en medios alcalinos el ion superóxido es más estable y la dismutación es más lenta. De acuerdo con la [Ecuación 4.15](#) el pK_a del ácido conjugado del $O_2^{\bullet-}$ (HO_2^{\bullet}) es 4.89, sin embargo, el $O_2^{\bullet-}$ aún es capaz de abstraer protones de donadores suficientemente fuertes para producir el radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), el cual puede dismutar según la [Ecuación 4.18](#):



La reacción anteriormente descrita entra en competencia con la dismutación de la especie protonada, provocando una disminución en la rapidez de reacción, formando en su lugar iones hidroperoxido (HO_2^-) ([Halliwell y Gutteridge, 2015](#); [Hayyan et al., 2016](#); [D. Sawyer, 1991](#); [Villamena, 2013](#)).

4.3.2 Formación de $O_2^{\bullet-}$ en solventes apróticos

El estudio de la formación del ion superóxido en solventes apróticos polares con técnicas como la voltamperometría cíclica y de barrido lineal, así como la polarografía en fuentes más antiguas, indican una estabilidad de la especie electrogenerada a partir de la reducción del oxígeno disuelto. El aumento en la vida media del ion superóxido en medios apróticos como dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (AcN) y dimetilsulfóxido (DMSO) ha permitido conocer más acerca de la reactividad de

este ion radical con diferentes sustratos. La estabilidad del $O_2^{\bullet-}$ depende en gran parte de su grado de solvatación, a mayor solvatación: mayor estabilidad porque disminuye su activación. Además del disolvente, se ha encontrado que el material del electrodo de trabajo es muy importante para evitar reacciones no deseadas: electrodos de platino, oro y mercurio muestran una aparente irreversibilidad al aumentar la separación de los picos en los voltamperogramas cíclicos a causa de reacciones del ion superóxido con el material del electrodo, las cuales además se favorecen en medios donde el ion superóxido está poco solvatado, caso contrario a lo que ocurre con electrodos de carbono vítreo (Jain, 1982; Maricle y Hodgson, 1965; D. T. Sawyer et al., 1982; Vasudevan y Wendt, 1995).

La influencia del tipo de electrolito ya sea perclorato de tetrabutilamonio (TBAP), perclorato de tetraetilamonio (TEAP) o hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF₆, Figura 4.8) parece no afectar la reversibilidad del sistema, a menos que sea un donador de protones, como es el caso con NH₄ClO₄ o HNO₃ (D. Sawyer y Roberts, 1966).

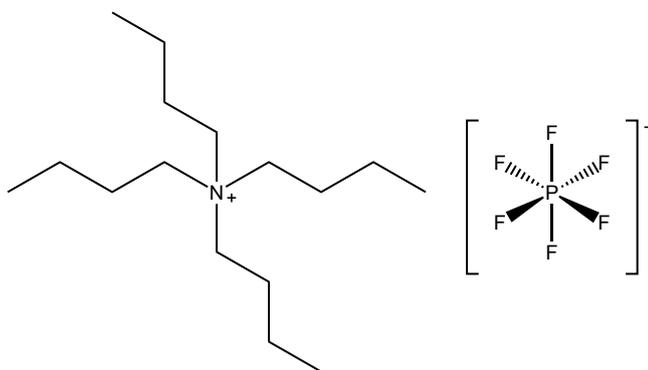


Figura 4.8. Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio

4.4 Antioxidantes

La acumulación de especies reactivas de oxígeno en el organismo llega a ser perjudicial para la salud de las personas, así como también puede afectar las propiedades organolépticas de los alimentos almacenados. Una alta concentración de especies oxidantes como pueden ser las ROS alteran el estado redox celular, modificando las estructuras de los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y por lo tanto su funcionamiento. Sin embargo, al igual que se pueden generar especies oxidantes por diferentes motivos (contaminación ambiental, envejecimiento,

señalización celular, defensa inmune, procesos fisiológicos), el organismo produce y obtiene antioxidantes de los alimentos para contrarrestar sus efectos nocivos (Ahmad, 2016; Gulcin, 2020).

Un antioxidante desde el punto de vista biológico es cualquier compuesto capaz de retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato, estando presente en una concentración considerablemente más baja que este último. Este concepto puede también ser aplicado a los alimentos en donde la función del antioxidante es prevenir o retardar la oxidación de los productos alimenticios durante su procesamiento, embalaje o almacenamiento, ayudando así a conservar su sabor, olor, textura y apariencia. Por lo tanto, los antioxidantes desarrollan un papel vital tanto en los alimentos como en el cuerpo humano al reducir los procesos oxidativos y los efectos dañinos de los oxidantes (Gulcin, 2020; Pisoschi y Pop, 2015).

Una descompensación de antioxidantes respecto a oxidantes o bien una falta de ellos en la dieta diaria conlleva a un estado de estrés oxidativo, un estado en el que se favorece la producción y proliferación de radicales libres los cuales ejercen un deterioro en las funciones fisiológicas, promueven la incidencia de enfermedades y reducen la esperanza de vida (Pisoschi y Pop, 2015). Los antioxidantes entonces contribuyen a la mejora del estado redox celular interactuando con los radicales libres a través de diferentes mecanismos: (1) eliminando especies precursoras de la peroxidación lipídica, (2) coordinándose a iones metálicos inhabilitando su potencial de generar ROS o descomponer peróxidos, (3) agotando el radical superóxido para prevenir la formación de peróxidos, (4) interrumpiendo la reacción en cadena de autooxidación y (5) reduciendo las concentraciones localizadas de oxígeno (Oroian y Escriche, 2015). De acuerdo con lo anterior, los antioxidantes pueden clasificarse de diferentes maneras: enzimáticos y no enzimáticos, inhibidores o reparadores, endógenos y exógenos, primarios y secundarios, hidrosolubles y liposolubles, naturales o sintéticos (Pisoschi y Pop, 2015).

Entre los antioxidantes naturales y sintéticos, los compuestos fenólicos son en su mayoría los que cubren toda esta clasificación. Los compuestos fenólicos más simples poseen al menos un grupo fenol en su estructura base, como es el caso de los monofenoles 3-etilfenol y 3,4-dimetilfenol presentes en frutas y semillas (Gulcin, 2020). De igual manera, pero sintéticos: butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol

(BHA) y galato de propilo (PG). Dependerá también de las diferentes sustituciones, ramificaciones y demás grupos funcionales lo que divide a los antioxidantes fenólicos naturales en: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, coumarinas, lignanos, taninos y tocoferoles, [Figura 4.9 \(Shahidi y Ambigaipalan, 2015\)](#).

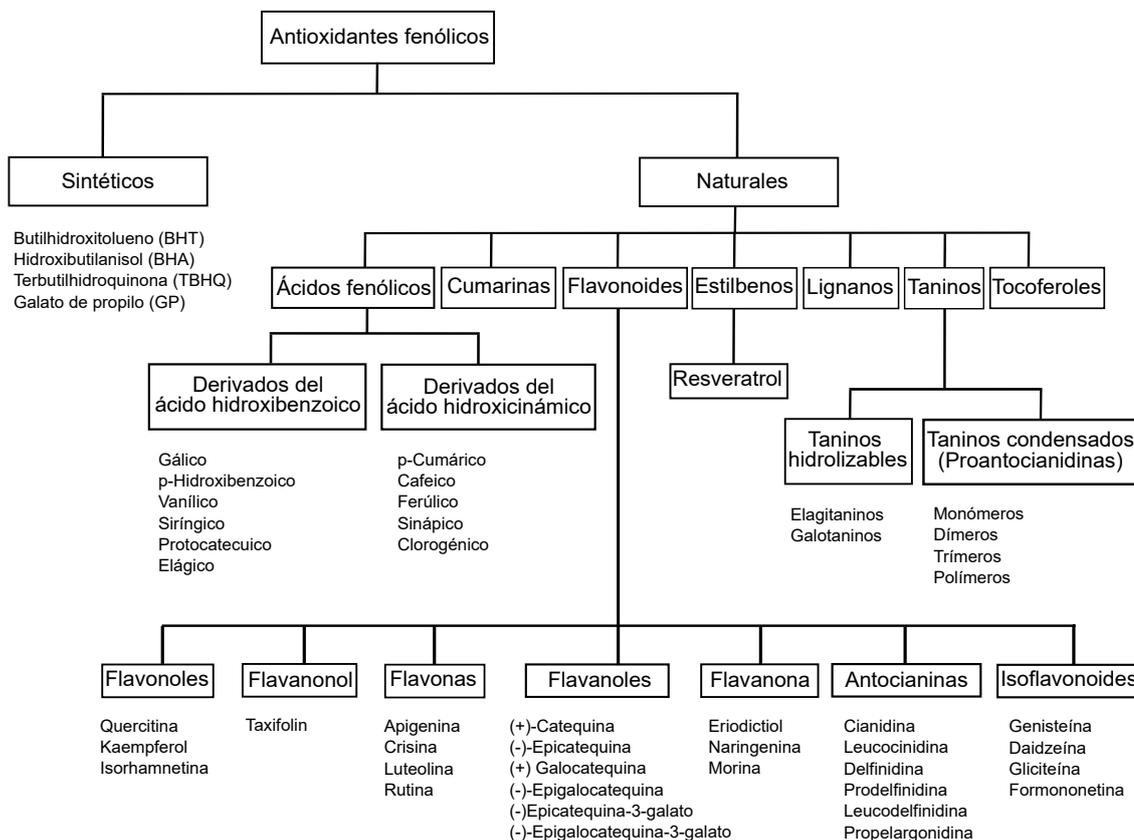


Figura 4.9. Clasificación de compuestos antioxidantes fenólicos. Figura realizada con base en [Shahidi y Ambigaipalan \(2015\)](#).

El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la localización y número de grupos hidroxilo en las moléculas, y de efectos estéricos y electrónicos ([Figura 4.10](#)). Es por ello que los compuestos fenólicos no presentan actividad antioxidante a menos que sustituyentes en posiciones orto- o para- incrementen la densidad electrónica en el grupo hidroxilo, permitiendo así la estabilización del radical formado en la reacción con la especie oxidante ([Gulcin, 2020](#)).

En las últimas décadas ha habido una creciente preocupación por la utilización de antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria y de bebidas, algunos estudios reportan el uso de BHA y BHT como responsables del daño hepático y carcinogénesis cuando se usan en altos niveles en animales. Así también TBHQ y PG

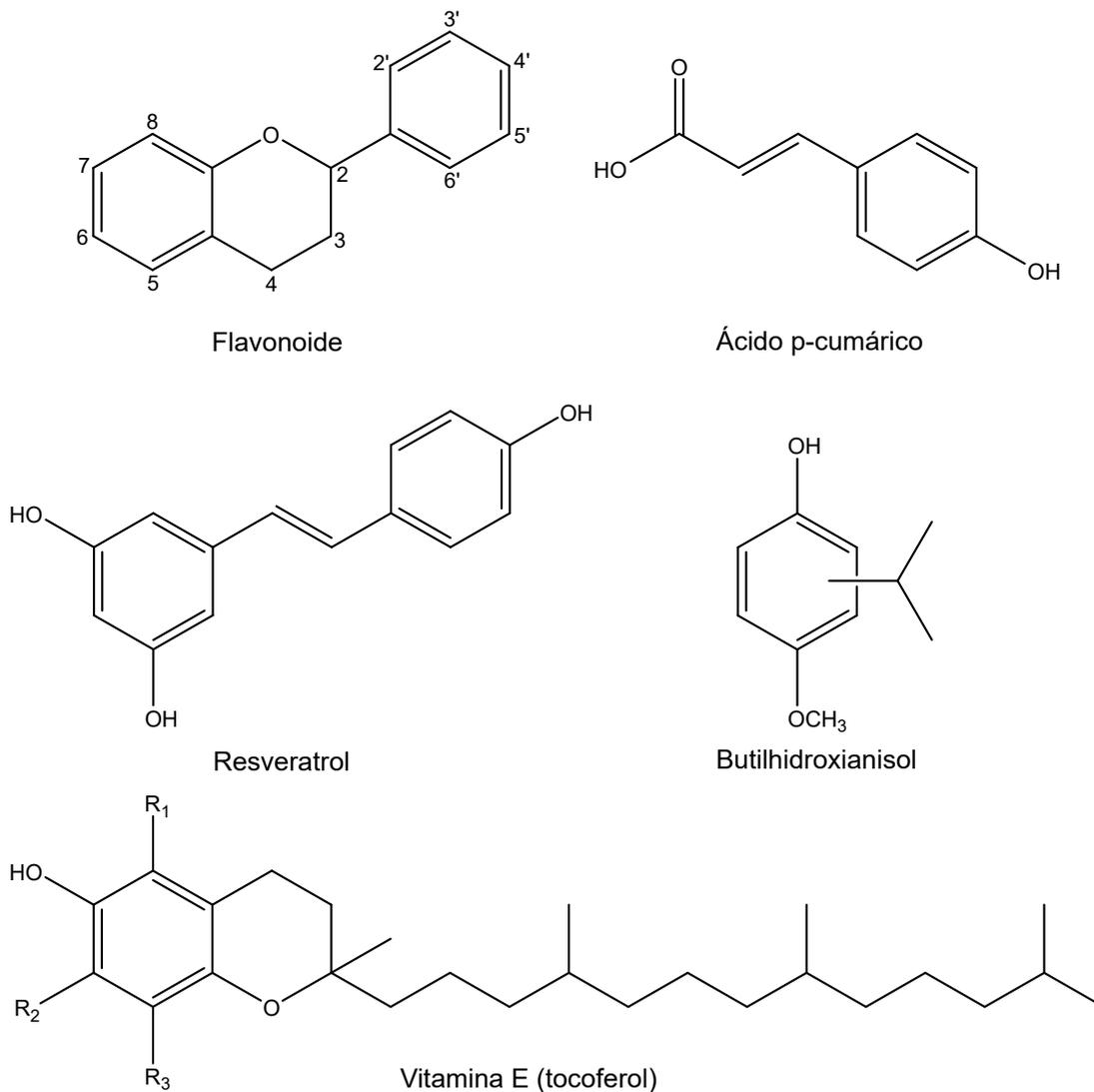


Figura 4.10. Estructuras químicas de algunos antioxidantes representativos

forman complejos moleculares con las estructuras de los ácidos nucleicos, entre ellos el ADN, afectando su estructura de doble hélice. El resultado de las investigaciones ha preocupado a diversos organismos internacionales como la FDA, OMS y FAO, y en consecuencia, existe una estricta regulación en las cantidades usadas de antioxidantes sintéticos. La mayoría no rebasa el 0.02% del contenido en grasas y aceites. A pesar de que la tendencia actual y en el futuro es sustituir los antioxidantes sintéticos por los naturales, varios de ellos no han sido evaluados con la misma urgencia de saber si son teratogénicos o mutagénicos (Gulcin, 2020; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

En conclusión, el uso de antioxidantes sintéticos o naturales es mejor que no utili-

zarlos. Las especies oxidantes que se forman, entre ellas los radicales libres, son más perjudiciales que los antioxidantes en sí mismos (Gulcin, 2020).

4.4.1 Galato de propilo

El galato de propilo (PG, por sus siglas en inglés) o 3,4,5-trihidroxibenzoato de propilo (Figura 4.11) es un antioxidante sintético generalmente reconocido como seguro (GRAS) utilizado desde el año 1948 en alimentos que contienen grasas y aceites para evitar su rancidez debido a la formación de peróxidos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015), así como en cosméticos (Becker, 2007). Es producido a través de una esterificación del ácido gálico y propanol. La autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA) dio al galato de propilo el número E 310, un antioxidante autorizado con un nivel máximo permitido (MPL) entre 25 y 400 mg/kg de acuerdo con el tipo de alimento (EFSA, 2014).

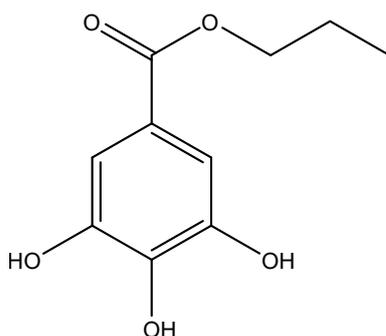


Figura 4.11. El galato de propilo, éster propílico del ácido gálico, es un sólido blanco y cristalino. Tiene un peso molecular de 212.2 g/mol. Es soluble en agua y en solventes orgánicos como etanol, DMSO y DMF. La solubilidad del PG en estos solventes es aproximadamente 3.5, 10, 15 y 20 mg/mL, respectivamente.

Estudios realizados por Medina et al. (2013) reportan el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) como la principal vía de actividad antioxidante del PG frente a los radicales $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{OOCH}_3$ y $\cdot\text{OOCHCH}_2$, en medios lipídicos (pentiletanoato) y el mecanismo de transferencia de protón (TP), en medios acuosos, siendo la forma desprotonada (PG^-) más activa que PG. Por otra parte, René et al. (2010) en un estudio de monofenoles y polifenoles utilizando voltamperometría cíclica concluyen que el mecanismo de transferencia de protón es el que predomina en la reactividad de los antioxidantes frente a radicales libres, sin embargo, mencionan que también hay una contribución de el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno. Respecto a los polifenoles resulta que el mecanismo de TAH

es el principal en la actividad antioxidante. Debido a las múltiples combinaciones que se pueden lograr haciendo simulaciones con todas las posibles reacciones, no descartan la posibilidad de algún otro mecanismo alternativo que involucre la formación de aductos o un mecanismo de transferencia electrónica acoplada a protón (CPET) que pueda explicar la formación de los pre-picos anódicos en la simulaciones computacionales que realizaron.

Los efectos a la salud del galato de propilo son muy diversos. Posee un efecto antiangiogénico, una propiedad deseada en el tratamiento del cáncer al disminuir la formación de nuevos vasos sanguíneos inhibiendo el crecimiento de tumores por la disminución de nutrientes y oxígeno (Blundell et al., 2022). Puede reducir la formación de caries y al mezclarse con meclociclina potencia su efecto antibacterial. Sin embargo, algunos otros estudios señalan que causa hepatotoxicidad y aumenta la carcinogénesis. Además en presencia de cobre(II) la propiedad antioxidante del galato de propilo lo convierte en un agente prooxidativo, citotóxico y genotóxico.

4.5 Actividad antioxidante

Uno de los parámetros más importantes para evaluar a un antioxidante es su actividad antioxidante. Esta propiedad representa la habilidad para inhibir el proceso de oxidación por parte de una especie con alto potencial redox. La evaluación se realiza mediante la reacción directa entre el candidato a antioxidante y especies oxidantes, por lo tanto, los antioxidantes actúan como agentes reductores en solución.

Además del término “actividad antioxidante”, existen otros como: capacidad antioxidante, poder antioxidante, actividad antiradical y poder antiradical. Todos ellos de alguna manera hacen referencia a propiedades antioxidantes. Sin embargo, la mayoría no tienen una definición clara de lo que representan. En algunos trabajos por una interpretación equivocada de la palabra “actividad” los utilizan como sinónimos.

Los dos términos comúnmente aceptados son actividad y capacidad antioxidante. La actividad antioxidante se refiere a la rapidez de reacción entre el antioxidante y la especie oxidable. Por otra parte, capacidad antioxidante hace alusión a la cantidad

(en mol) de radicales eliminados por un mol de antioxidante (Haque et al., 2021).

La falta de claridad en la terminología, sumada a una carencia de unidades comparables entre diferentes investigaciones, causan muchas confusiones en esta área de estudio, debido a que los métodos para determinar la actividad antioxidante se basan en diferentes principios, utilizan diferentes materiales de referencia y expresan sus resultados en unidades relativas a estos materiales de referencia. Adicionalmente, las especies oxidantes que utilizan, por ejemplo, radicales libres sintéticos, no tienen nada en común con las especies oxidantes que realmente podemos encontrar en los organismos. En consecuencia, limitan el uso de los datos disponibles convenientes para poder sugerir un tratamiento clínico, elegir una terapia o evaluar el estado de los alimentos (Brainina et al., 2019).

La ventaja en este sentido de los métodos electroquímicos es no depender de un material de referencia y proporcionar la información directa sobre la concentración del analito. En este sentido resulta adecuado utilizar el término “actividad” antioxidante para realizar la comparación por vía electroquímica del desempeño de distintos antioxidantes frente a especies reactivas de oxígeno y otros oxidantes.

4.6 Métodos para determinar la actividad antioxidante

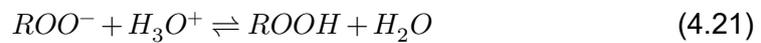
La evaluación de la actividad/capacidad antioxidante en muestras biológicas y alimentos ha surgido por la necesidad de determinar su aporte nutricional o bien para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Capanoglu et al., 2022). Por otra parte, la distinta naturaleza química tanto de las especies oxidantes como de los antioxidantes, así como el medio que les rodea, hace difícil su separación, cuantificación e incluso su detección (Apak et al., 2013), por lo que actualmente existen diversos métodos para medir la actividad antioxidante. La mayoría de ellos se fundamentan en propiedades espectroscópicas, como la absorción molecular, la fotoluminiscencia (fluorescencia) o la quimioluminiscencia ya sea de la muestra (prueba), la especie oxidante (radical) o el antioxidante (Danet, 2021; Xiao et al., 2020).

Los métodos para determinar la actividad antioxidante, también conocidos como ensayos, pueden clasificarse de manera general en dos grandes grupos: métodos

basados en la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) y métodos basados en la transferencia de electrones (ET). Algunos otros ensayos se consideran que pueden actuar bajo ambas situaciones, por lo que son ensayos mixtos.

4.6.1 Métodos basados en la transferencia de electrón (ET)

En el mecanismo de acción antioxidante de métodos ET, uno o más electrones son transferidos para reducir al analito de acuerdo con el siguiente esquema (Apak et al., 2016):



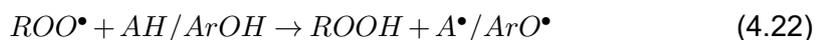
La principal desventaja respecto con los métodos HAT, es la dependencia del pH, del solvente y que son relativamente más lentos. Por ejemplo, algunos compuestos fenólicos con grupos -OH débilmente ácidos se encuentran más disociados a pH altos; entonces al aumentar el pH son más susceptibles a la oxidación, debido a que sus potenciales de ionización disminuyen conforme se incrementa la basicidad del medio, favoreciendo la transferencia electrónica junto con la desprotonación, razón por la cual la mayoría de las reacciones ET son más rápidas a valores más altos de pH (Apak et al., 2016). Otro punto desfavorable de los métodos ET es que no utilizan agentes oxidantes biológicamente relevantes como lo son las ROS en sus ensayos, por lo que difieren de lo que realmente ocurre en los sistemas biológicos (Apak et al., 2016; Capanoglu et al., 2022; Kotha et al., 2022).

Los métodos espectrofotométricos ET miden la capacidad de un antioxidante sobre un oxidante, al experimentar un cambio de color debido a la reducción. El cambio de color (incremento o decremento) modifica la absorbancia de la muestra a una longitud de onda fija y a partir del cambio en la absorbancia se correlaciona con la concentración del antioxidante en la muestra (Xiao et al., 2020).

Entre los métodos ET más conocidos se encuentran: Folin-Ciocalteu, FRAP (ferric reducing antioxidant power, CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) y CERAC (cerium (IV)-based reducing antioxidant capacity).

4.6.2 Métodos basados en la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT)

Por su parte, los métodos HAT miden la habilidad de donar un átomo de hidrógeno (H^\bullet) por un antioxidante hacia un radical libre, generalmente radicales peroxilo (Apak et al., 2013). Una de las principales características de estos ensayos es que son competitivos, es decir, hay una competencia directa entre la muestra y el antioxidante por el radical libre, de modo que la velocidad de reacción del antioxidante debe ser mayor que la prueba para poder ser considerado un antioxidante. Esto último define el principio por el cual funcionan los métodos HAT, debido a que durante el inicio de la reacción existe una etapa denominada fase de inducción, en la que la prueba (colorida o fluorescente) compite por el radical (ROO^\bullet), de modo que el antioxidante retarda la oxidación y con ello la disminución de la absorbancia o fluorescencia. La actividad antioxidante se determina integrando el área bajo la curva en presencia y ausencia de antioxidantes, de las gráficas de absorción/fluorescencia en función del tiempo (Apak et al., 2016; Xiao et al., 2020).



En los ensayos donde utilizan muestras fluorescentes, uno de los puntos más criticados es que la concentración de las especies objetivo es mucho menor que la de los antioxidantes, lo cual contradice su definición (Apak et al., 2016). También existe cierta ambigüedad en cuanto al tiempo de punto final de los ensayos, haciendo difícil comparar los resultados entre laboratorios, además que después de este punto no se toma en cuenta la contribución del resto de antioxidantes. Por otra parte, en los ensayos in vitro no siempre se utilizan los mismos materiales de referencia, Trolox, α -tocoferol y ácido gálico, entre los más comunes, para antioxidantes hidrofílicos, lipofílicos y soluciones acuosas de polifenoles, respectivamente (Apak et al., 2016).

Los métodos más comunes basados en la transferencia de átomos de hidrógeno son: ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total peroxy radical trapping antioxidant parameter), TOSC (total oxyradical scavenging capacity) y crocin bleaching.

4.6.3 Métodos mixtos

Los métodos mixtos siguen los mismos principios que los métodos ET y HAT, con la ventaja de poder evaluar la contribución de la actividad/capacidad antioxidante por ambos mecanismos. Sin embargo, utilizan radicales libres irrelevantes fisiológicamente por lo que han sido criticados al igual que los de transferencia electrónica (Capanoglu et al., 2022).

Como ejemplos de métodos mixtos podemos encontrar: ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)/ Trolox equivalent antioxidant capacity), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y DMPD (dihidroclouro de N,N-dimetil-p-fenilendiamina).

4.6.4 Métodos electroquímicos

Algunos de los inconvenientes y dificultades en cuanto a las muestras y su preparación en los métodos ET y HAT, así como a los propios fundamentos de las técnicas espectroscópicas, ha limitado su uso en diferentes matrices complejas o coloridas para determinar su actividad antioxidante, permitiendo a los métodos electroquímicos ser una alternativa para solucionar estos problemas. Además, los métodos electroquímicos se han caracterizado por ser rápidos, precisos, sensibles y reproducibles. Los distintos parámetros que se pueden obtener a través de ellos como el potencial redox, la capacidad antioxidante total y el mecanismo de reacción involucrado en el intercambio de electrones, les confiere una ventaja competitiva sobre los anteriores (Danet, 2021; Haque et al., 2021).

Las técnicas electroquímicas más utilizadas para investigar el comportamiento electroquímico de los antioxidantes son: voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría diferencial de pulsos (DPV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV), cronamperometría (CA) y coulombimetría (Haque et al., 2021; Sochor et al., 2013).

La voltamperometría cíclica es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA). Del voltamperograma resultante se obtienen las corrientes de pico (i_p), el potencial de pico (E_p) y el potencial de media onda ($E_{1/2}$). La corriente de pico da información sobre la concentración de antioxidantes disueltos o el número de electrones intercambiados por el antioxidante, mientras que el potencial de pico muestra la facilidad de la molécula para donar

sus electrones (Haque et al., 2021). Moléculas con bajos potenciales de oxidación se asocian entonces con una alta actividad antioxidante (Sochor et al., 2013).

Haque et al. (2021) mencionan algunos puntos a tomar en cuenta al realizar mediciones electroquímicas de antioxidantes en alimentos:

- Los potenciales aplicados tienen que ser reportados respecto a un electrodo de referencia; sin embargo, en algunos casos se observan variaciones entre electrodos de referencia del mismo tipo, por lo que se sugiere reportar los potenciales relativos a los potenciales redox estándar de un par oxidante/reductor independiente del pH.
- Las mediciones electroquímicas pueden realizarse con diferentes disolventes, concentración de reactivos y pH, por lo que es aconsejable medir el efecto que tienen sobre la reactividad del antioxidante. De igual forma, se pueden utilizar diferentes electrolitos, por lo que también se aconseja medir su efecto porque existe la posibilidad que no sean completamente inertes frente a la reacción de interés.
- La limpieza del electrodo junto con el registro de los cambios de potencial de circuito abierto (OCP) en las subsecuentes mediciones, se consideran una buena práctica. Por otra parte, mostrar los resultados de un segundo escaneo en voltamperometría cíclica y la disponibilidad de software para realizar simulaciones podría ayudar a entender el proceso electroquímico.

4.7 Técnicas electroquímicas

Los métodos electroquímicos poseen un gran potencial para la investigación de compuestos antioxidantes, la evaluación de la actividad/capacidad antioxidante, y la medición de un índice electroquímico, que se define como el contenido total de polifenoles empleando técnicas electroquímicas (Blasco et al., 2005). Pueden emplearse diferentes tipos de técnicas para los propósitos mencionados, por ejemplo, potenciodinámicas, como la voltamperometría diferencial de pulsos, onda cuadrada o cíclica; potencioestáticas, como la cronoamperometría, o galvanostáticas, como la cronopotenciometría. Las nuevas adaptaciones que han tenido los métodos electroquímicos sobre los espectroscópicos en la evaluación de muestras biológicas en

los estudios clínicos y en los alimentos, es una de las principales razones por las que ahora son más conocidos (Sochor et al., 2013).

Los experimentos se llevan a cabo en una celda electroquímica de tres electrodos (Figura 4.12). En el electrodo de trabajo (ET) ocurre la semirreacción redox de interés (oxidación o reducción), tiene una superficie relativamente pequeña respecto al segundo electrodo, el contraelectrodo (CE), donde ocurre la otra semirreacción, con la diferencia de tener una superficie lo suficientemente grande para no limitar la rapidez de la reacción de interés. Entre estos dos electrodos se mide la corriente generada del proceso en el ET, una corriente faradaica porque el proceso de transferencia de carga entre el ion y el electrodo obedece la ley de Faraday, la cual debe distinguirse de las corrientes no faradaicas o de carga como las corrientes capacitivas que no transfieren electrones en la interfase solución-electrodo. Un tercer electrodo, electrodo de referencia (ER), se conecta al de trabajo para medir la diferencia del potencial aplicado. Este electrodo posee un potencial constante porque sus componentes están a una alta concentración para despreciar el flujo de corriente que pudiera fluir a través de él, y se coloca cerca al electrodo de trabajo para disminuir la contribución del potencial de caída óhmica durante la medición.

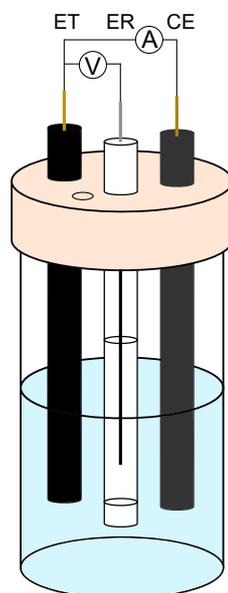


Figura 4.12. Representación esquemática de una celda electroquímica de tres electrodos. Se utiliza una alta impedancia en el voltímetro, V, para asegurar que no haya paso de corriente durante la medición del potencial entre el ET y el ER. En algunos ensayos puede también ser necesario trabajar en atmósfera de nitrógeno o algún otro gas inerte por lo que es necesario un orificio en la cubierta donde están sujetos los electrodos para permitir el ingreso del gas y algún otro para su salida, o para hacer las adiciones del analito sin desmontar el sistema. Figura realizada con base en Elgrishi et al. (2018).

De acuerdo con la ecuación unidimensional de Nernst-Planck (Ecuación 4.23), existen tres diferentes mecanismos por los cuales una especie electroactiva puede transportarse desde el seno de la disolución hacia la superficie del electrodo. El primer transporte por considerar es la difusión, debida a la presencia de regiones con diferentes concentraciones (gradiente de concentración), por lo que el sistema tenderá a distribuir las especies en disolución de regiones con alta concentración a regiones de baja concentración. La migración es el segundo transporte y sucede cuando existe un gradiente de potencial eléctrico, el campo eléctrico resultante moverá a los cationes hacia el electrodo con potencial más bajo mientras que los aniones se moverán al electrodo con potencial más alto. El último transporte es la convección, resultado del movimiento mecánico por alguna fuerza externa como la agitación térmica o mecánica, o fortuita por las colisiones o vibraciones de la celda electroquímica.

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_i v(x) \quad (4.23)$$

Donde J_i es el flujo ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), D_i es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C_i es la concentración (mol cm^{-3}), z_i es el número de carga de la especie, $\partial \phi / \partial x$ (V cm^{-1}) es el gradiente de potencial, y $v(x)$ es la velocidad de la solución en la dirección x (cm s^{-1}).

Para facilitar el estudio del proceso de transferencia electrónica se prefiere que la difusión sea el único transporte que predomine sobre los demás. Por lo tanto, se utiliza un electrolito soporte en altas concentraciones (0.1 mol L^{-1} KCl en disoluciones acuosas o sales de perclorato de tetraalquilamonio en las no acuosas) comparadas con la especie electroactiva para despreciar el movimiento del analito por migración al aplicar un potencial. Igualmente, al mantener el sistema sin agitación se evita la contribución por convección (Zanello, 2003).

Al considerar el equilibrio electroquímico de reducción entre la interfase solución-electrodo,



además de trabajar con electrodos estacionarios y electrolito soporte, la difusión

se describe con base en las leyes de Fick. La primera ley de Fick establece que el flujo de la especie (Ox) es equivalente al producto entre una constante de proporcionalidad (coeficiente de difusión, D) y el gradiente de concentración:

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} \quad (4.25)$$

Por otra parte, al considerar una visión macroscópica de la difusión en estado no estacionario, es decir, dependiente del tiempo, la variación de la concentración con el tiempo, $\partial C/\partial t$, puede expresarse mediante la segunda ley de Fick (Bockris y R, 2003):

$$\frac{\partial C_i(x)}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i(x)}{\partial x^2} \quad (4.26)$$

Esta ecuación diferencial de derivadas parciales es el resultado de la diferenciación de una función primitiva. Dicha función es de interés debido que nos muestra la dependencia funcional entre concentración, espacio y tiempo. La manera más simple de hallar la solución de la Ecuación 4.26 es mediante el uso de la transformada de Laplace, para convertir la ecuación diferencial parcial a una ecuación diferencial total u ordinaria (EDO), dependiente de una sola variable. Para resolver ahora la EDO se necesitan establecer condiciones iniciales y en el límite, dos con respecto a x y una respecto al tiempo. Aplicando las condiciones, resolviendo la EDO y calculando después la transformada inversa, obtenemos finalmente la función primitiva que describe la dependencia de la concentración con el tiempo y la distancia, $c = f(x, t)$ (Bard y Faulkner, 2001):

$$C_{Ox}(x, t) = C_O^* \left\{ 1 - \operatorname{erfc} \left[\frac{x}{2(D_{Ox}t)^{1/2}} \right] \right\} \quad (4.27)$$

$$C_{Ox}(x, t) = C_O^* \operatorname{erf} \left[\frac{x}{2(D_{Ox}t)^{1/2}} \right] \quad (4.28)$$

Donde erf es la función error y erfc el complemento, y C^* es la concentración en el seno de la disolución. El resto de las variables tienen el mismo significado ya mencionado. La representación gráfica de la concentración en función de la distancia al electrodo a diferentes tiempos (perfiles de concentración) se muestra en la Figura 4.13.

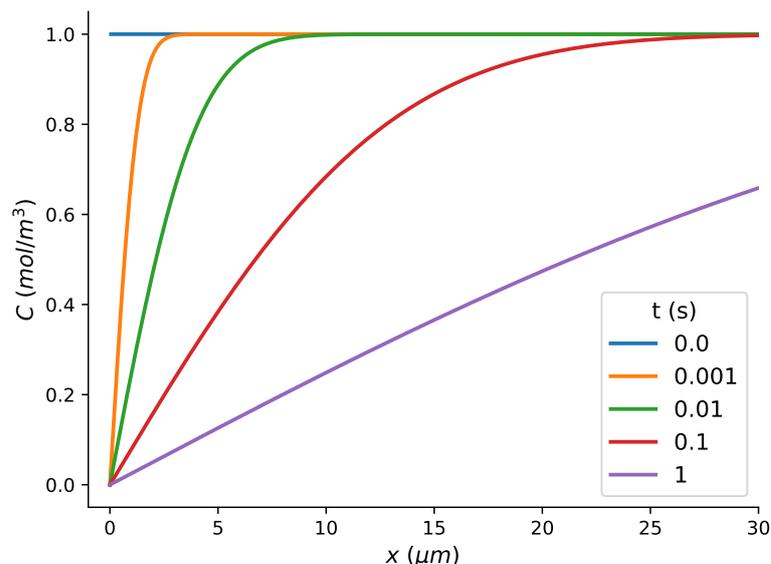


Figura 4.13. Perfiles de concentración de la especie Red conforme transcurre el tiempo después de aplicar un potencial en el que Red es completamente oxidada en el electrodo. Figura realizada con base en Girault (2004).

4.7.1 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV, por sus siglas en inglés) es una técnica electroanalítica ampliamente utilizada en química para la determinación de propiedades redox de moléculas en disolución. El potencial del electrodo de trabajo se escanea linealmente a una velocidad determinada ($v, \text{V s}^{-1}$) respecto al de referencia y se registra la respuesta en corriente producida (Chevion et al., 2000). El barrido de potencial se hace desde un potencial de inicio E_1 hasta un potencial de inversión E_2 y regresa nuevamente a E_1 formando un ciclo (Figura 4.14). La representación gráfica de la corriente en función del potencial aplicado produce una curva característica conocida como voltamperograma. En la Figura 4.15 se muestra un voltamperograma cíclico del par oxígeno/superóxido. En el barrido catódico ocurre una reducción de O_2 a $O_2^{\bullet-}$ (punto A), con la formación de un pico. El potencial en este punto se denomina potencial de pico catódico, E_{pc} , y su intersección con el eje y , corriente de pico catódica, I_{pc} . Asimismo, invirtiendo el sentido del barrido se obtiene un segundo pico (punto B), en este caso anódico, debido a la oxidación de $O_2^{\bullet-}$ a O_2 , la corriente y el potencial de pico en este punto se representan como I_{pa} y E_{pa} , respectivamente.

En un experimento en régimen de difusión pura (sin agitación), el transporte de ma-

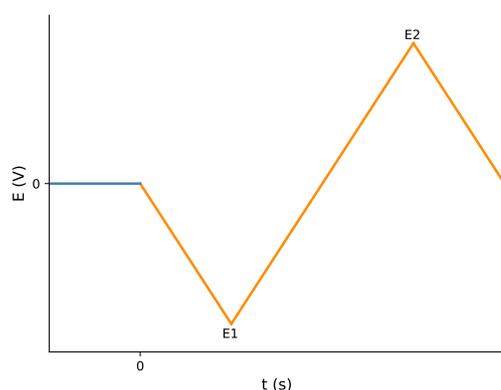


Figura 4.14. Programa de escaneo de potencial a una velocidad de barrido fija, v , que determina las pendientes de las rectas.

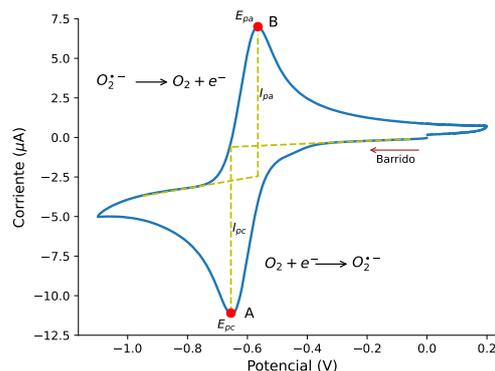


Figura 4.15. Voltamperograma cíclico del superóxido en un electrodo de disco de carbón vítreo en DMSO/0.1 M TBAPF₆. Velocidad de barrido de 0.1 V s⁻¹. En medios apróticos, el radical O₂⁻ es razonablemente estable y la reducción de O₂ es una reacción apreciablemente reversible.

teria del analito se lleva a cabo solo por difusión, y para el caso cuando ocurre una oxidación de una especie Red, la corriente aumenta hasta alcanzar un pico. En este último instante todo Red se ha oxidado a Ox en la superficie del electrodo lo que conduce a una situación que, para que siga habiendo una respuesta en corriente, Red debe viajar por difusión a la superficie del electrodo. Sin embargo, en ese momento la concentración de Ox continúa aumentando, y en consecuencia el grosor de la capa de difusión, lo que provoca que la distancia que Red tiene que recorrer también aumente. Visualmente esto se puede apreciar en el voltamperograma como una disminución de la corriente después que se alcanza el pico.

Uno de los parámetros más importantes al momento de hacer un estudio voltamperométrico es la rapidez de barrido con la que se explora el potencial aplicado. Para procesos de transferencia de electrones electroquímicamente reversibles, la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 4.29, a 25°C) describe cómo la corriente de pico (I_p , en A) es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido v (V s⁻¹).

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_{Ox}^{1/2} C_{Ox}^* v^{1/2} \quad (4.29)$$

Donde n es el número de electrones intercambiados y las unidades de A en cm², D en cm² s⁻¹, C en mol cm⁻³ y v en V s⁻¹.

Para sistemas irreversibles (procesos redox con cinética lenta de transferencia de

electrones en comparación al transporte de materia):

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n(n' + \alpha_{n'})^{1/2} A D_{Ox}^{1/2} C_{Ox}^* v^{1/2} \quad (4.30)$$

Donde n' es el número de electrones transferidos antes de la transferencia electrónica determinante de la rapidez y $\alpha_{n'}$ es el coeficiente de transferencia del paso lento (LI, 2014).

Decir que un sistema es reversible, irreversible o bien cuasirreversible es relativo a la transferencia de materia. El parámetro de Matsuda-Ayabe, Λ (Ecuación 4.31), establece la reversibilidad cinética que han de cumplir los sistemas utilizando macroelectrodos para considerarse en una u otra categoría (LI, 2014).

$$\Lambda = \frac{k^0}{\left(\frac{FDv}{RT}\right)^{1/2}} \quad (4.31)$$

k^0 es la constante heterogénea de intercambio de electrones, F la constante de Faraday, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. Los límites para cada caso son:

Reversible	$\Lambda \geq 15$	$k^0 \geq 0.3v^{1/2}$
Cuasi-reversible	$15 > \Lambda > 10^{-3}$	$0.3v^{1/2} > k^0 > 2 \times 10^{-5} v^{1/2}$
Irreversible	$\Lambda \leq 10^{-3}$	$k^0 \leq 2 \times 10^{-5} v^{1/2}$

Para un proceso redox como el de la Ecuación 4.24 (coeficientes estequiométricos iguales a uno) con cinética rápida de transferencia de electrones al equilibrio, la concentración de la especie oxidada y reducida está relacionada con el potencial del electrodo, E , por medio de la ecuación de Nernst (Ecuación 4.32):

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{Ox} C_{Ox}^*}{\gamma_{Red} C_{Red}^*} = E^{o'} + 2.3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad (4.32)$$

donde E es el potencial del electrodo, E^o es el potencial estándar del par Ox/Red, $E^{o'}$ es el potencial formal, a_{Ox} y a_{Red} las actividades del oxidante y reductor, γ_{Ox} y γ_{Red} sus coeficientes de actividad, y C_{Ox} y C_{Red} sus concentraciones respectivas.

4.7.2 Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica donde la intensidad de corriente es medida como una función del tiempo. Consiste en monitorear la respuesta en corriente por una variación en el potencial del electrodo desde un valor de potencial en donde solo una especie redox es estable en solución, ya sea la forma oxidada o reducida, hasta un potencial de electrodo donde ocurra una reducción u oxidación (Girault, 2004).

Considerando una reacción redox reversible electroquímicamente en donde la rapidez de reacción es mucho mayor que el transporte de masa y tanto el flujo como la concentración de las partículas que se difunden varían con el tiempo, y además aplicamos un potencial de electrodo adecuado para garantizar que toda la especie se encuentre oxidada o reducida, entonces la corriente estará controlada por un flujo de difusión, matemáticamente expresada como (Girault, 2004):

$$I = nFAC^* \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (4.33)$$

Donde I es la corriente, n el número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday, A el área del electrodo, D el coeficiente de difusión, C^* la concentración en el seno de la disolución, x la distancia desde la superficie del electrodo y t el tiempo.

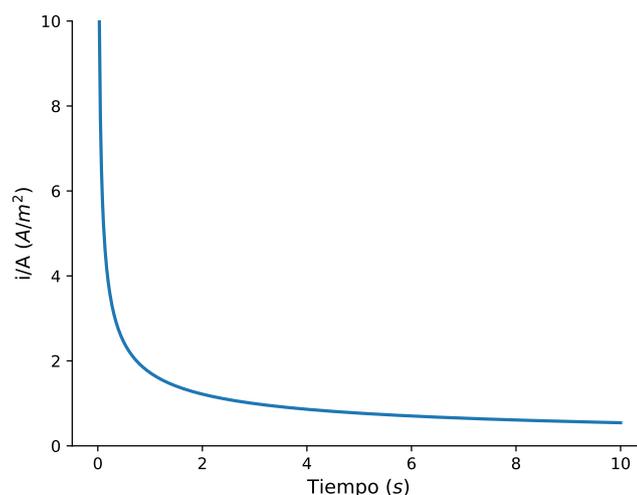


Figura 4.16. Variación de la densidad de corriente conforme transcurre el tiempo de acuerdo con la ecuación de Cottrell. Figura realizada con base en Girault (2004).

Esta última relación, conocida como ecuación de Cottrell, es válida si el transporte de materia ocurre únicamente por difusión, y muestra que la intensidad de corriente es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, lo que provoca una disminución de la corriente conforme transcurre el experimento (Figura 4.16), como resultado de la reducción en el flujo de sustancia electroactiva debido al aumento del espesor de la capa de difusión, por lo que menos material llega a la superficie del electrodo por unidad de tiempo (Bard y Faulkner, 2001).

CAPÍTULO V: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Reactivos

Dimetilsulfóxido anhidro(DMSO), galato de propilo, PG (>%98, Sigma Aldrich), hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF₆, >%98, Sigma Aldrich), agua desionizada (18 MΩ cm) y acetona RA.

5.2 Instrumentos

Las mediciones electroquímicas se hicieron utilizando un potencióstato portátil marca PalmSens 3 a través del software del fabricante (PS Trace 5.9).

El galato de propilo y el TBAPF₆ se pesaron utilizando una balanza semimicroanalítica de la marca METTLER TOLEDO, modelo XP105DR.

El agua desionizada se obtuvo con un equipo PURELAB Ultra de la marca ELGA.

El electrodo de trabajo de carbono vítreo, el electrodo de referencia de alambre de plata y el ultramicroelectrodo de platino utilizados fueron de la marca CHInstruments. El contraelectrodo fue una barra de grafito.

Para la limpieza del electrodo de carbono vítreo se utilizó una pulidora de la marca BUEHLER, modelo metaServ 250.

5.3 Procedimiento experimental

Los experimentos electroquímicos se realizaron en una celda de tres electrodos, un electrodo de disco de carbono vítreo (electrodo de trabajo, 3 mm de diámetro, 0.071 cm²), un electrodo de pseudoreferencia (alambre de plata en contacto con una disolución del electrolito soporte en DMSO, [ANEXO A, página 66](#)) y una barra de grafito como contraelectrodo (ca. 2.6 cm² de superficie expuesta en la disolución). Cada uno de los electrodos están conectados a las terminales correspondientes de un potencióstato de la marca PalmSens 3 el cual se opera con ayuda de una computadora utilizando el software PSTrace 5.9.

Previo a cada medición, el electrodo se limpiaba en una pulidora con una suspensión de alúmina de tamaño 0.3 μm. Una vez que la superficie del electrodo lucía

brillante se enjuagaba con agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) para retirar el exceso de alúmina en los bordes y en la superficie activa del electrodo. Posteriormente el electrodo se enjuagaba con acetona (grado analítico) para retirar el exceso de agua y dejarlo lo más seco posible debido a las condiciones de reacción (medio polar aprótico).

El electrolito soporte utilizado fue una disolución de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF₆) 0.1 mol L^{-1} en DMSO anhidro. Los ensayos voltamperométricos y cronoamperométricos se hicieron en presencia y ausencia de galato de propilo. Para ello se prepararon disoluciones 15 mmol L^{-1} y 55 mmol L^{-1} de galato de propilo con la disolución del electrolito, y a partir de estas se fueron agregando alícuotas de $10 \mu\text{L}$ en $10 \mu\text{L}$ a 5.0 mL del electrolito soporte contenidos en la celda electroquímica, esto para conocer la variación de las corrientes y los potenciales de pico para cada adición o velocidad de barrido.

El primer ensayo se hizo solo con el electrolito soporte para asegurar la cuasirreversibilidad electroquímica del par $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$ en el electrolito, y el buen funcionamiento del potencióstato y de los electrodos. El programa se configuró en una ventana de potencial de -1.1 V a 0.2 V , iniciando en 0.0 V con un barrido catódico y a una velocidad de barrido de 0.1 V s^{-1} .

Posteriormente se realizaron ensayos con $10 \mu\text{L}$ de la disolución 55 mmol L^{-1} de galato de propilo en 5 mL de electrolito soporte en ausencia de oxígeno a diferentes velocidades de barrido ($10\text{-}500 \text{ mV}$) para conocer la ventana de electroactividad de nuestro analito (-0.2 a 1.5 V) y su cinética. Para ello se burbujeó la solución de la celda electroquímica con N_2 , durante 15 minutos, una vez agregado el galato de propilo.

Los siguientes experimentos se hicieron sin burbujear nitrógeno, es decir, la celda electroquímica estaba expuesta al oxígeno atmosférico en equilibrio con el oxígeno disuelto en el electrolito (0.3 mmol L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Belmont-Bernal et al. (2016)). Posteriormente se fueron agregando a la celda alícuotas de $10 \mu\text{L}$ de la disolución 55 mmol L^{-1} de PG hasta completar 7 adiciones ($70 \mu\text{L}$ en total). Las concentraciones de PG después de cada adición en 5 mL del electrolito contenidos en la celda fueron: 110 , 219 , 328 , 437 , 545 , 652 y $759 \mu\text{mol L}^{-1}$. Estos últimos experimen-

tos se repitieron, pero ahora agregando alícuotas de 5 y 10 μL de la disolución 15 mmol L^{-1} de PG hasta completar 6 adiciones (50 μL en total, 2 de 5 μL y 4 de 10 μL). Las concentraciones de PG en estos casos fueron: 15, 30, 60, 90, 120 y 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Durante los experimentos a diferentes concentraciones se hicieron también mediciones cronoamperométricas. Para la reacción de reducción se aplicó un pulso de potencial desde -0.2 V hasta -0.85 V que duró 1.5 s, para después aplicar un segundo pulso de potencial desde -0.85 V hasta -0.2 V, llevándose a cabo la oxidación con la misma duración.

La determinación del coeficiente de difusión del galato de propilo, así como el número de electrones intercambiados se hizo mediante cronoamperometría y voltamperometría utilizando para ello un ultramicroelectrodo de platino de 10 μm de diámetro sobre el que, debido al tamaño de su superficie, la difusión del analito hacia el electrodo es semi-esférica en lugar de semi-infinita como lo es en el caso de los macroelectrodos.

El mecanismo de reacción propuesto para la reacción del galato de propilo con el ion superóxido fue elucidado con ayuda de un programa de computación llamado Digielch de la compañía Gamry Instruments. En este software se pueden simular las reacciones de transferencia de carga y químicas que están involucradas en un mecanismo de reacción determinado. El programa puede o no trabajar con datos experimentales para hacer la simulación. Sin embargo, al incorporar datos experimentales el programa ajusta el mecanismo propuesto a los datos reales. El programa realiza una optimización de cada uno de los parámetros cinéticos y termodinámicos mediante una regresión no lineal en la que minimiza la desviación estándar por iteraciones de los datos simulados y experimentales, para al final obtener los nuevos parámetros ajustados. En el presente trabajo se utilizó Digielch 8 para simular los resultados de los voltamperogramas y cronoamperogramas obtenidos experimentalmente. De esta manera se plantea un mecanismo de reacción que explica el comportamiento del sistema al ir aumentando la concentración de galato de propilo en cada adición.

CAPÍTULO VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Experimentos electroquímicos

De los experimentos en presencia de oxígeno, en cada sesión experimental se iniciaba con un voltamperograma del electrolito, al haber solo oxígeno disuelto en la disolución en equilibrio con la atmósfera (0.3 mmol L^{-1}) y al ser la única especie electroactiva en la ventana de potencial, se utilizó como referente de la limpieza del electrodo y de la preparación del electrolito. La interpretación de la forma del voltamperograma de la [Figura 6.1](#) se puede entender mediante la ecuación de Nernst. A medida que disminuye el potencial del electrodo se observa un incremento de la corriente faradaica que indica el inicio de la transferencia electrónica desde el conductor electrónico hacia el oxígeno disuelto en el conductor iónico, lo cual quiere decir que los electrones en el electrodo son de mayor energía que el orbital molecular más bajo desocupado (LUMO) del oxígeno, la diferencia de energía promueve la transferencia electrónica y el oxígeno se reduce a superóxido. La semirreacción de reducción genera una respuesta en corriente que irá aumentando hasta alcanzar un máximo conocido como corriente de pico, en este caso, catódico.

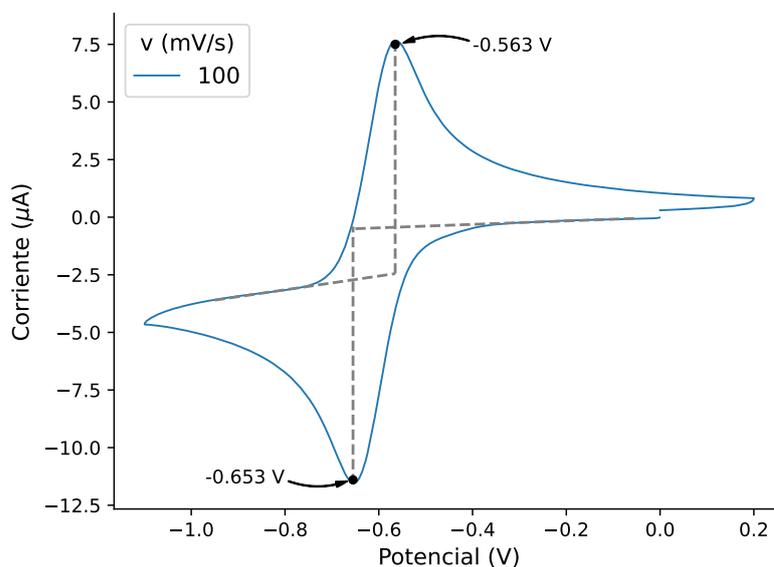


Figura 6.1. Voltamperograma cíclico del par $O_2/O_2^{\bullet-}$ en DMSO a 0.1 V s^{-1} en presencia de $TBAPF_6$ 0.1 mol L^{-1} . ET: carbono vítreo; ER: alambre de plata con una disolución 0.1 mol L^{-1} $TBAPF_6$ en DMSO; CE: barra de grafito. De acuerdo con la literatura, los coeficientes de difusión para el O_2 y $O_2^{\bullet-}$ son $D_{Oxígeno} = 4.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $D_{Superóxido} = 1.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Gonzaga, 2019), y la constante heterogénea de intercambio de electrones (k^0) igual a 0.014 cm s^{-1} (Belmont-Bernal et al., 2016).

Una vez alcanzada la corriente de pico, se observa que la corriente empieza a disminuir conforme sigue disminuyendo el potencial. La razón de este comportamiento es que, al disminuir el potencial del electrodo, la capa de difusión también crece, retardando el transporte del oxígeno desde el seno de la disolución hacia la superficie del electrodo según los perfiles de concentración mostrados anteriormente en la [Figura 4.13](#). Entonces, por más que disminuya el potencial, el proceso global de reducción del oxígeno estará limitado por la difusión, siendo la transferencia de carga más rápida que el transporte de materia, por lo que a medida que el oxígeno llega al electrodo inmediatamente se reduce y forma superóxido. Más adelante en el experimento, una vez que se alcanza el valor del potencial de inversión (-1.1 V), comienza el barrido anódico, esta vez hacia potenciales más altos. El ion superóxido recién formando y localizado en la vecindad del electrodo, ahora experimentará una reacción de oxidación, formando oxígeno molecular conforme se aproxime el potencial del electrodo al potencial estándar del par redox, lo cual se verá reflejado en un aumento paulatino de la corriente de oxidación hasta alcanzar el pico anódico (-0.563 V). Nuevamente los iones superóxido difundirán hacia la superficie del electrodo y el flujo disminuirá a medida que aumenta el potencial de electrodo y crece la capa de difusión, limitando la reacción de oxidación y observándose una disminución de la corriente anódica en función del inverso multiplicativo de la raíz cuadrada del tiempo.

6.1.1 Experimentos para el PG en ausencia de O_2

Los resultados del galato de propilo en ausencia de O_2 se muestran en la [Figura 6.2](#). En este caso el barrido de potencial inicia en 0.0 V hacia un potencial negativo de -0.2 V, después comienza el barrido anódico hasta 1.5 V en donde se invierte el sentido del barrido y regresa nuevamente a 0.0 V completando el ciclo. Fueron 10 μL de concentración 55 mmol L^{-1} de galato de propilo los que se agregaron para hacer los experimentos a diferentes velocidades de barrido. El rango de velocidades de barrido estuvo comprendido entre 10 y 500 mV. Para cada una de las velocidades se hizo también la exploración en ausencia de galato de propilo, esto para restar la contribución del electrolito a la corriente faradaica. El resultado de la resta del electrolito se muestra en la [Figura 6.2a](#). Como se puede observar,

el voltamperograma presenta un comportamiento irreversible, debido a que las corrientes anódicas y catódicas son de magnitudes diferentes y los potenciales de pico están muy desplazados entre sí, además que se logra apreciar la formación de otra especie en el barrido anódico al incrementar la rapidez, lo que sugiere una reacción química acoplada a la reacción electroquímica o el radical del PG recién formado sufre una segunda oxidación para formar la quinona correspondiente de acuerdo con (Gunckel et al., 1998), lo que impide que el proceso sea reversible químicamente y a su vez electroquímicamente, porque la especie que se reduce al invertir el barrido, no es la misma que la que se oxida o quizás solo una pequeña fracción de la especie oxidada se reduce debido a que el resto reaccionó químicamente formando una especie no electroactiva en el rango de potencial utilizado, provocando la disminución de la corriente catódica. También se observa que la corriente catódica crece al aumentar la velocidad de barrido, posiblemente por una competencia con la constante de rapidez de la reacción química acoplada.

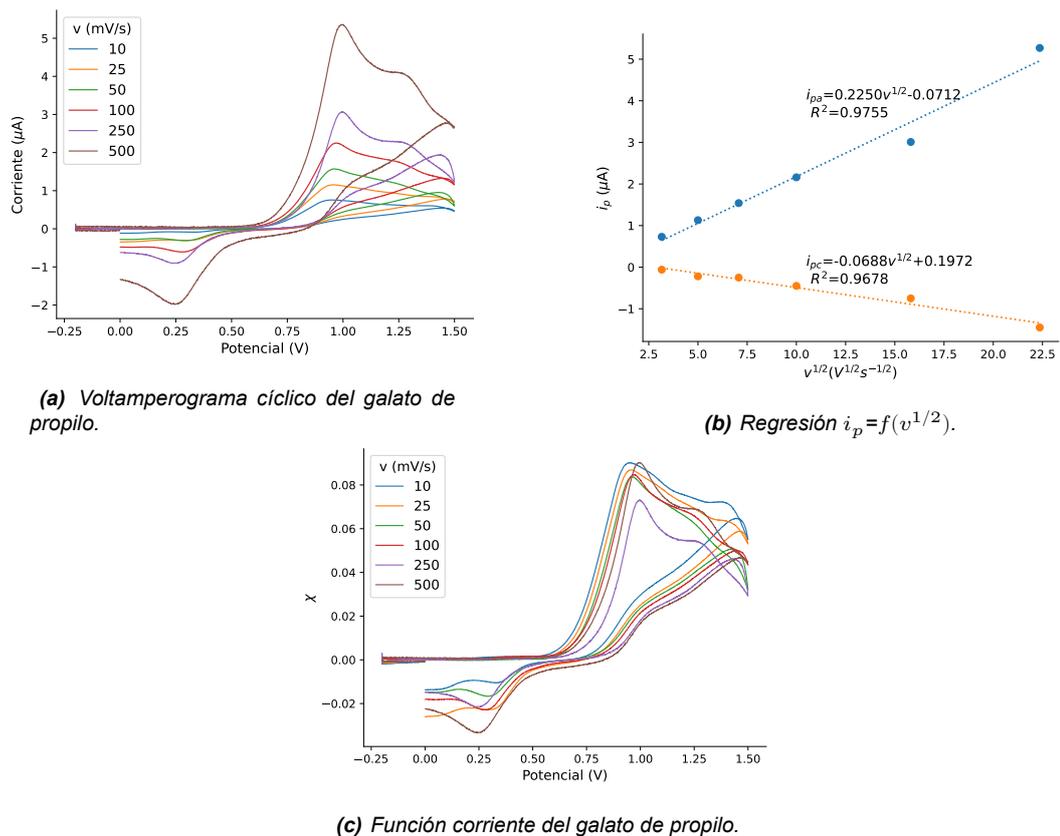


Figura 6.2. Resultados del galato de propilo añadiendo una alícuota de $10 \mu\text{L}$ de concentración 55 mmol/L a la disolución de electrolito soporte bajo atmósfera de N_2 . ET: carbono vítreo; ER: alambre de plata con una disolución 0.1 mol L^{-1} TBAPF₆ en DMSO; CE: barra de grafito.

El ajuste lineal en el gráfico de las corrientes de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 6.2b) expone una transferencia de materia controlada por difusión, obteniéndose el mejor ajuste para las corrientes anódicas.

Por otra parte, en la Figura 6.2c se representa la función corriente (Ecuación 6.1) construida a partir de los datos de los voltamperogramas anteriores. La función corriente se utiliza para conocer si hay complicaciones mecánicas o de irreversibilidad que de otra manera serían difíciles de interpretar solo con los voltamperogramas.

$$\chi(\sigma t) = \frac{i}{nFAC\sqrt{\pi D\sigma}} \quad (6.1)$$

Donde $\chi(\sigma t)$ es la función corriente y σ representa la rapidez de barrido, i , n , t , F , A , C y D tienen su significado usual.

Para sistemas reversibles el gráfico de la función corriente a distintas velocidades de barrido es el mismo porque se estandariza la corriente al dividirla entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, tomando en cuenta que la corriente de pico depende de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik, lo que evidentemente no se logra en la Figura 6.2c y por tanto apoya la afirmación de ser un sistema irreversible.

6.1.2 Experimentos para el PG (disolución 55 mmol/L) en presencia de O₂

En cuanto a los resultados en presencia de oxígeno a diferentes concentraciones de PG (Figura 6.3), al ir aumentando la concentración del galato de propilo por cada adición, aparece un prepico catódico que aumenta significativamente y se desplaza a potenciales más bajos conforme incrementa la concentración; asimismo, el pico catódico crece ligeramente y se desplaza a potenciales más altos. Esto podría deberse a la formación de un aducto seguido por una transferencia de átomo de hidrógeno (Ahmed y Shakeel, 2012).

La aparición del prepico catódico puede deberse a la formación de un aducto entre el recién formado ion superóxido a potenciales relativamente más altos que los observados en ausencia del PG. A medida que aumenta la concentración de galato

de propilo se forma también más aducto y por eso el prepico crece. Como en este punto la reducción de oxígeno está sucediendo de forma temprana, agregar más PG favorece también que sea mayor la cantidad de superóxido que genere una respuesta en corriente en el pico catódico (Figura 6.3a), parte puede provenir de la desintegración del aducto previamente formado y el resto del oxígeno disuelto presente.

La presencia de un antioxidante capaz de donar su electrón como lo es el galato de propilo junto al recién formado radical superóxido, idóneo para aceptarlo, favorece la reacción entre los dos, por lo tanto, al invertir el sentido del barrido hacia la oxidación la cantidad de superóxido disponible ya no es la misma que cuando el galato de propilo estaba ausente, pues una parte de él reaccionó por lo que la cantidad de oxígeno que ahora se puede formar es inferior que en la condición en la que no había PG. Visualmente esto se puede apreciar en la disminución de la corriente anódica al agregar más antioxidante. Es decir, el galato de propilo tuvo que oxidarse para estabilizar al ion superóxido, convirtiendo el sistema de reversible a irreversible. Además, se detecta una segunda señal anódica que crece con la concentración de antioxidante, en este caso el radical del PG estabilizado por resonancia puede ser electroactivo a una segunda oxidación para terminar de estabilizarse.

Los resultados de los cronoamperogramas a diferentes concentraciones muestran cómo disminuye y aumenta la corriente en función del tiempo para la reducción y oxidación, respectivamente (Figura 6.3c y Figura 6.3d). La tendencia es similar a lo observado en los voltamperogramas, un aumento en las corrientes catódicas y una disminución en las anódicas.

6.1.3 Experimentos para el PG (disolución 15 mmol/L) en presencia de O₂

Los experimentos anteriores se repitieron haciendo adiciones de 5 y 10 uL partiendo ahora de una disolución 15 mmol/L de PG. Los resultados se muestran en la Figura 6.4. Entre las principales diferencias están que las corrientes de pico catódicas decrecen ligeramente en valor absoluto conforme se agrega PG, podemos decir que se mantienen constantes (Figura 6.4a), contrario a lo que pasaba con las adiciones de concentración 55 mmol/L, en donde se observa un aumento significati-

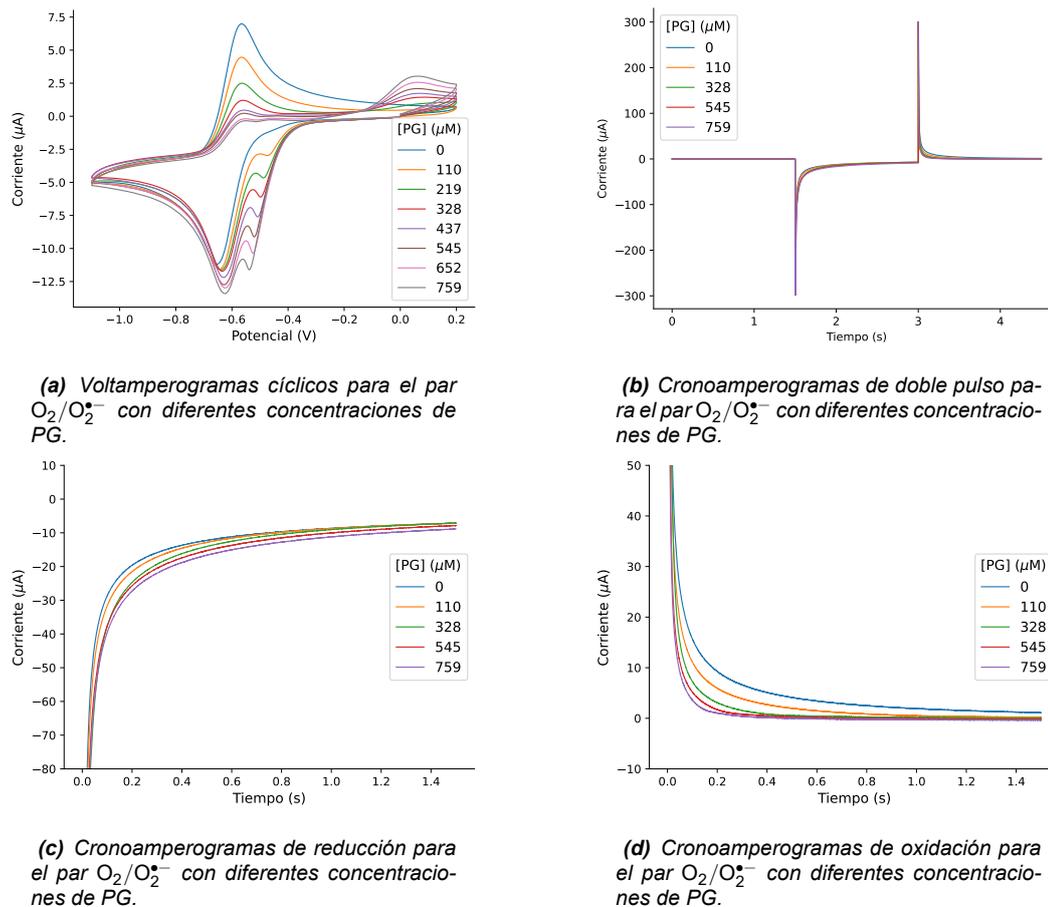


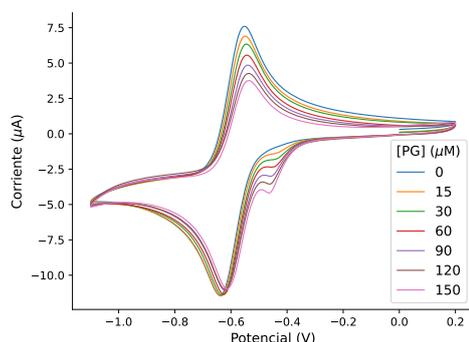
Figura 6.3. Resultados experimentales para el sistema $O_2/O_2^{\bullet-}$ a diferentes concentraciones de PG (disolución 55 mmol/L). El pulso de potencial para la reducción fue de -0.2 V hasta -0.85 V y para la oxidación de -0.85 V a -0.2 V. ET: carbono vítreo; ER: alambre de plata con una disolución 0.1 mol L⁻¹ TBAPF₆ en DMSO; CE: barra de grafito.

vo. Sin embargo, los picos siguen creciendo, pero con magnitudes inferiores por ser menor la concentración. Análogamente las corrientes de pico anódicas presentan una disminución menos pronunciada por lo que el sistema es aparentemente quasi-reversible. Por último, la segunda señal anódica que se mostraba a mayores concentraciones en los voltamperogramas de la [Figura 6.4a](#) ahora está ausente.

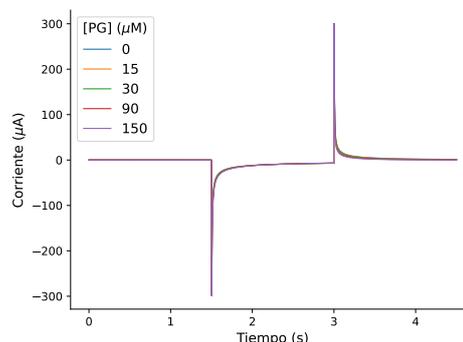
La explicación a la primera diferencia en donde las corrientes catódicas se mantienen constantes puede interpretarse con lo previamente mencionado, la formación del aducto en este nuevo rango de concentraciones es menos evidente, por lo tanto, su contribución a la producción del radical superóxido no es significativa por lo que prácticamente todo el $O_2^{\bullet-}$ que se forma proviene del oxígeno disuelto en la interfase electrolito-electrodo. A pesar de ello las corrientes anódicas disminuyen por la reacción directa entre el antioxidante y el $O_2^{\bullet-}$, algo que ya se podía ver en los

voltamperogramas a mayor concentración. De igual manera en los experimentos anteriores la formación de la segunda señal anódica no se observa en este nuevo rango de concentraciones de PG, concentraciones bajas.

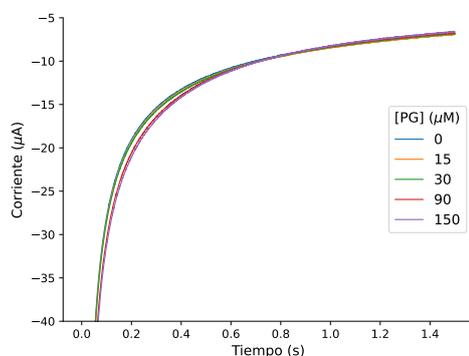
Por su parte las diferencias en los cronoamperogramas confirman la variación significativa de la corriente para las corrientes anódicas (Figura 6.4d), pero no así para las catódicas (Figura 6.4c), en estas últimas los cronoamperogramas se llegan a superponer por la pequeña diferencia de corriente que existe entre ellas y que ilustra lo que se observa en los voltamperogramas.



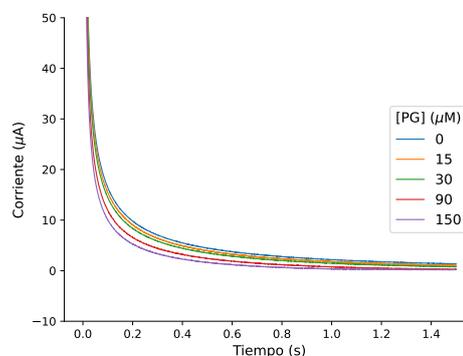
(a) Voltamperogramas cíclicos para el par $O_2/O_2^{\bullet-}$ con diferentes concentraciones de PG.



(b) Cronoamperogramas de doble pulso para el par $O_2/O_2^{\bullet-}$ con diferentes concentraciones de PG.



(c) Cronoamperogramas de reducción para el par $O_2/O_2^{\bullet-}$ con diferentes concentraciones de PG.



(d) Cronoamperogramas de oxidación para el par $O_2/O_2^{\bullet-}$ con diferentes concentraciones de PG.

Figura 6.4. Resultados experimentales para el sistema $O_2/O_2^{\bullet-}$ a diferentes concentraciones de PG (disolución 15 mmol/L). El pulso de potencial para la reducción fue de -0.2 V hasta -0.85 V y para la oxidación de -0.85 V a -0.2 V. ET: carbono vítreo; ER: alambre de plata con una disolución 0.1 mol L⁻¹ TBAPF₆ en DMSO; CE: barra de grafito.

Finalmente, a partir de los cronoamperogramas de la Figura 6.4b se realizó el gráfico de corriente en función de $t^{-1/2}$ de acuerdo con la ecuación de Cottrell, los resultados se muestran en la Figura 6.5a para la reducción y la Figura 6.6b para la oxidación. De los gráficos se puede interpretar que a tiempo largos ($t^{-1/2}$ más

bajos) y mayores concentraciones, la respuesta en corriente para los cronoamperogramas de oxidación empiezan a perder su linealidad, por lo que el sistema está controlado por difusión, sin embargo, a tiempos largos ocurren otras reacciones como la transferencia de electrón o protón entre el *PG* y el $O_2^{\bullet-}$ que desvían este comportamiento de la linealidad.

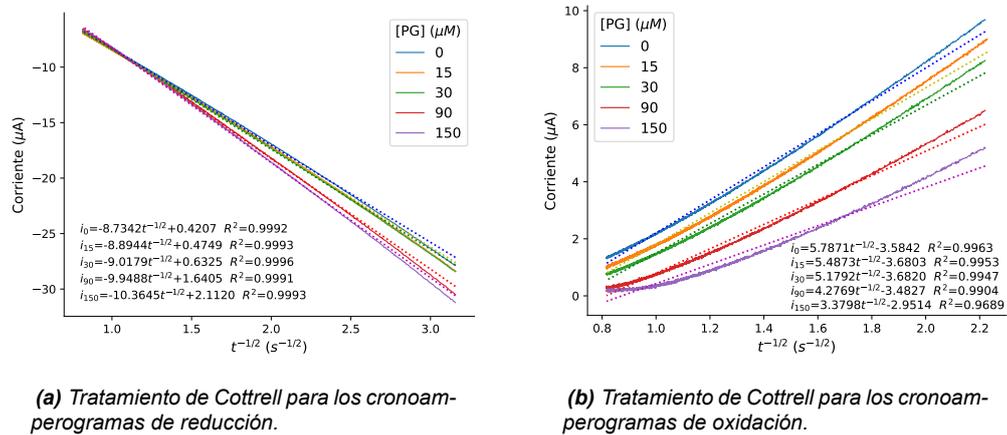


Figura 6.5. Resultados del tratamiento de Cottrell para los cronoamperogramas que se obtuvieron con adiciones de la disolución 15 mmol/L de *PG*.

6.1.4 Determinación del coeficiente de difusión y el número de electrones intercambiados del galato de propilo

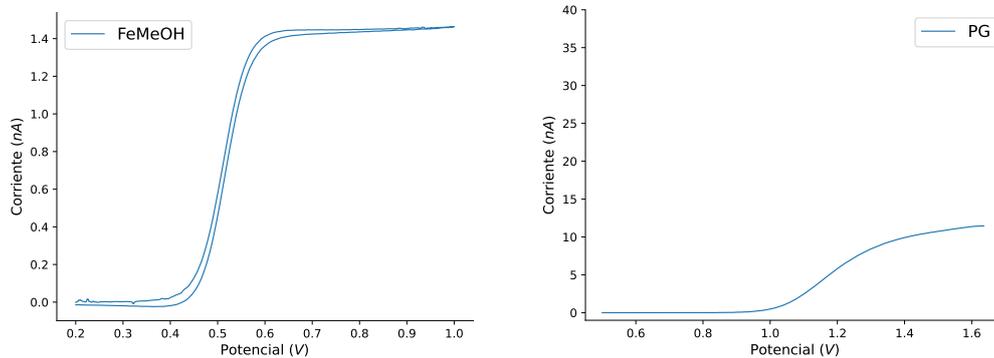
Para determinar el coeficiente de difusión del galato de propilo se realizó un voltamperograma cíclico utilizando un ultramicroelectrodo de platino de 10 μm de diámetro (Figura 6.6). La ventana de potencial fue desde -0.2 V hasta 1.0 V, iniciando y terminando en -0.2 V. La corriente de difusión en estado estacionario para estos sistemas es igual a:

$$i_{ss} = 4nFCDr \quad (6.2)$$

Donde i_{ss} es la corriente de difusión en estado estacionario y r el radio del electrodo. Al utilizar un material de referencia como el ferrocenmetanol (FcMeOH) en las mismas condiciones de nuestro analito podemos conocer el coeficiente de difusión o el número de electrones intercambiados si conocemos el otro parámetro. El cociente de corrientes de estado estacionario obtenidas por voltamperometría con el ultramicroelectrodo muestra cómo se puede obtener este resultado:

$$\frac{i_{ss}}{i_{ss}^*} = \frac{9.726 \times 10^{-9} \text{ A}}{1.44 \times 10^{-9} \text{ A}} = \frac{4nFCDr}{4n^*FC^*D^*r} = \frac{nCD}{C^*D^*} \quad (6.3)$$

Donde i_{ss}^* es la corriente de estado estacionario del ferrocenmetanol, n^* es su número de electrones intercambiados, C^* su concentración y D^* el coeficiente de difusión. Para este sistema se conoce con precisión que el número de electrones que intercambia es igual a 1 ($n^* = 1$). La concentración de FcMeOH que se utilizó fue de 1.93 mmol L^{-1} , el radio $5 \times 10^{-6} \text{ m}$ y F igual a $96485.33 \text{ C mol}^{-1}$. De esta manera, de la Ecuación 6.2, D^* es igual a $3.87 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.



(a) Voltamperograma cíclico del ferrocenmetanol. $[FcMeOH] = 1.93 \text{ mmol L}^{-1}$.

(b) Voltamperograma cíclico del galato de propilo. $[PG] = 11.05 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 6.6. Voltamperogramas cíclicos para FeMeOH y PG en la disolución del electrolito soporte utilizando un microelectrodo de Pt como ET. ER: alambre de plata con una disolución 0.1 mol L^{-1} TBAPF₆ en DMSO; CE: barra de grafito. Velocidad de barrido = 20 mV s^{-1} .

Si suponemos ahora que el galato de propilo intercambia también 1 electrón ($n = 1$). El coeficiente de difusión D , del PG es igual a:

$$D = \frac{i_{ss}C^*D^*}{i_{ss}^*nC} = \frac{(9.726 \times 10^{-9} \text{ A})(1.93 \text{ mmol L}^{-1})(3.87 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})}{(1.44 \times 10^{-9} \text{ A})(1)(11.05 \text{ mmol L}^{-1})} \quad (6.4)$$

$$D = 4.57 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \quad (6.5)$$

Al repetir el experimento cinco veces, se obtiene un valor promedio del coeficiente de difusión del galato de propilo de:

$$D = 4.5 \times 10^{-6} \pm 0.1 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \quad (6.6)$$

donde el valor $0.1 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ representa la desviación estándar de los datos. Hasta donde sabemos (o tenemos conocimiento) no se encuentra reportado en la literatura el valor de D para el galato de propilo bajo estas condiciones de estudio.

De igual manera, pero ahora realizando una cronoamperometría (Figura 6.7) con un pulso de potencial de 0.1 a 1.4 V, la corriente de estado estacionario para la oxidación de una disolución 7.78 mmol L^{-1} de PG fue de 6.54 nA . Por lo que asumir que el PG intercambia un electrón implica que al sustituir este valor y el del coeficiente de difusión anterior en la Ecuación 6.2 de estado estacionario debemos obtener una magnitud cercana a los 6.54 nA , solo si $n = 1$:

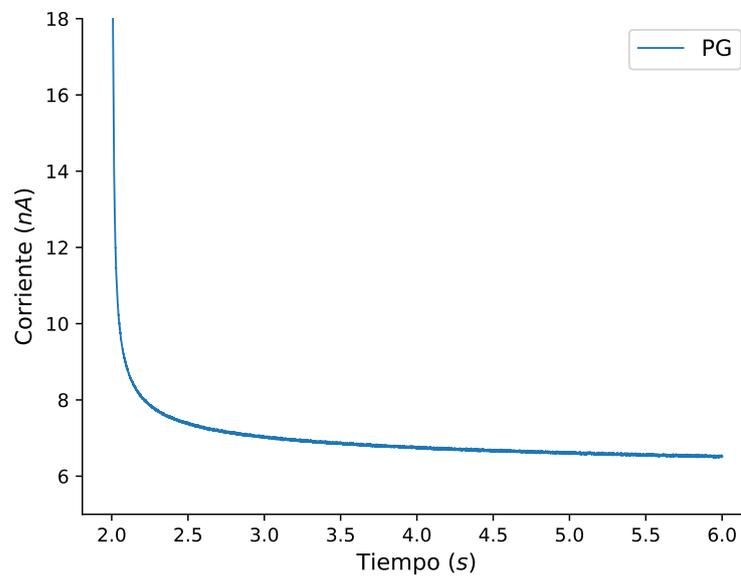


Figura 6.7. Cronoamperograma del galato de propilo ($[PG]=7.78 \text{ mmol L}^{-1}$) en el electrolito soporte utilizando un microelectrodo de Pt como ET. ER: alambre de plata con una disolución 0.1 mol L^{-1} TBAPF₆ en DMSO; CE: barra de grafito. Pulso de potencial de 0.1 a 1.4 V.

$$i_{ss} = 4nFCDr = 4(1)(96485.33 \text{ C mol}^{-1})(7.78 \text{ mol m}^{-3})(4.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})(5 \times 10^{-6} \text{ m}) \quad (6.7)$$

$$i_{ss} = 6.76 \times 10^{-9} \text{ A} = 6.76 \text{ nA} \quad (6.8)$$

De esta manera podemos considerar que el número de electrones que intercambia el PG es igual a 1, al ser el valor de $i_{ss} = 6.76 \text{ nA}$ cercano al que se obtuvo de manera experimental, $i_{ss} = 6.54 \text{ nA}$.

6.1.5 Simulación de los resultados experimentales obtenidos en voltamperometría y cronoamperometría

En voltamperometría cíclica, la formación de diferentes productos debido a reacciones químicas acopladas a la reacción principal, modifican los perfiles de los voltamperogramas. En algunos casos resulta complicado establecer qué reacciones están sucediendo porque dependiendo de la velocidad de barrido, concentración, ventana de potencial, entre otras variables, se forman diferentes picos y prepicos, y con ello también se pueden sugerir diferentes mecanismos de reacción.

Para solucionar este problema se utilizó el programa DigiElch 8 para simular los resultados de los voltamperogramas y cronoamperogramas que se obtuvieron haciendo adiciones de la disolución 15 mmol/L de galato de propilo. Las reacciones que se propusieron fueron las siguientes:



La última reacción química se plantea como irreversible para disminuir la concentración de superóxido, es decir, que el PG^- actúe como antioxidante, para que de esta manera al momento de hacer el barrido anódico sea menor la cantidad de oxígeno que se produzca observándose una disminución de la corriente anódica. La formación del producto P puede o no englobar a dos especies puesto que no participan en otra reacción, entonces, la especie quizás sea un anión radical del galato de propilo o también puede suceder que PG^- pierda un segundo protón y forme la quinona correspondiente.

El programa también permite para las reacciones de transferencia de carga (redox) establecer el potencial estándar, el coeficiente de simetría y la constante de transferencia de carga. En cuanto a las reacciones químicas lo que se ajusta son las constantes de equilibrio en caso de ser reversibles y las constantes de velocidad.

Los voltamperogramas de la [Figura 6.4a](#) se cargaron en el programa de simulación, en este caso se fijaron los parámetros de la reacción redox $O_2/O_2^{\bullet-}$ así como las concentraciones de cada una de las especies consideradas en el mecanismo. En cambio, las constantes de equilibrio y de velocidad se pidieron al programa las ajustara mediante la minimización de la desviación estándar por iteraciones.

Los resultados por pares (simulación/experimental) se muestran en la [Figura 6.8](#). Como se puede ver, el programa fue ajustando los valores de los parámetros del mecanismo por cada voltamperograma experimental, hasta finalmente obtener los valores ajustados (en azul) de las constantes de equilibrio y velocidad que se muestran en la [Tabla 6.1](#). En la [Figura 6.8h](#) se muestran todos los voltamperogramas simulados juntos. Es notorio que el mecanismo sugerido representa en buena medida lo que se obtuvo de manera experimental, es decir, cambios significativos en las corrientes anódicas, pero menos pronunciados en las catódicas, así como la formación de los prepicos que además crecen a mayor concentración de galato de propilo.

Reacciones de transferencia de carga	E^0 (V)	α	k_s (cm/s)
$O_2 + e^- \rightleftharpoons O_2^{\bullet-}$	-0.558	0.6	0.01
Reacciones químicas	K_{eq}	k_f	k_b
$PG + O_2^{\bullet-} \rightleftharpoons PGO_2^{\bullet-}$	1.9897x10 ⁶	1.25x10 ¹⁰	6282.2
$PGO_2^{\bullet-} \rightleftharpoons HO_2^{\bullet} + PG^-$	3.27x10 ⁷	323	9.8776x10 ⁶
$O_2^{\bullet-} + PG^- \rightarrow P$	—————	6.6048x10 ⁵	0
Especies	D (cm ² /s)	C_{anal} (mol/L)	
O_2	6x10 ⁻⁵	0.00025	
$O_2^{\bullet-}$	3x10 ⁻⁶	0	
PG	1x10 ⁻⁵	variable	
$PGO_2^{\bullet-}$	1x10 ⁻⁵	0	
HO_2^{\bullet}	1x10 ⁻⁵	0	
PG^-	1x10 ⁻⁵	0	
P	1x10 ⁻⁵	0	

Tabla 6.1. Mecanismo de reacción propuesto junto con los valores de cada uno de los parámetros de la simulación.

De igual manera, una vez que el mecanismo de reacción se ajustó a los voltamperogramas, se utilizó para hacer lo mismo con los cronoamperogramas, usando para

ello los nuevos valores ajustados. Los resultados de los cronoamperogramas por pares se muestran en la [Figura 6.9](#) y todos los simulados juntos en la [Figura 6.9f](#). Para una mejor apreciación de los cronoamperogramas de doble pulso se dividieron en cronoamperogramas de reducción y oxidación, [Figura 6.10a](#) y [Figura 6.10b](#), respectivamente. Nuevamente los gráficos son muy parecidos a los representados en la [Figura 6.4](#). En el caso de la reducción se traslapan entre sí y solo se logra ver un único cronoamperograma, en cambio en la oxidación las corrientes anódicas disminuyen por aumento de la concentración de PG.

Por último, se graficaron las corrientes anódicas y catódicas en función de $t^{-1/2}$ ([Figura 6.11](#)), siguiendo el mismo tratamiento de Cottrell. Los gráficos de la oxidación son semejantes a los de la [Figura 6.6b](#), sin embargo, los de la reducción se superponen debido a que los cronoamperogramas respectivos eran prácticamente los mismos para todas las concentraciones.

Como recurso adicional el programa Digielch tiene otros apartados en donde grafica por aparte los perfiles de concentración en función de la distancia y las concentraciones superficiales en función del potencial para cada especie. Los resultados se muestran en la [Figura 6.12](#) y [Figura 6.13](#).

6.1.5.1 Perfiles de concentración en función de la distancia al electrodo

El gráfico mostrado en la [Figura 6.12a](#) que se relaciona con el gráfico de la [Figura 6.8a](#) en los que el PG está ausente, detalla la variación de los perfiles de concentración en función de la distancia conforme se explora la ventana de potencial, al principio, cuando $E = 0$ y no se aprecia una corriente faradaica, las concentraciones de ambas especies son constantes ($O_2 = 0.25 \text{ mM}$ y $O_2^{\bullet-} = 0$), es decir,

$$\left. \frac{\partial [Ox]}{\partial x} \right|_{x=0} = - \left. \frac{\partial [Red]}{\partial x} \right|_{x=0} \approx 0 \quad (6.13)$$

debido a que el potencial es insuficiente para lograr la conversión de O_2 a $O_2^{\bullet-}$ en el barrido catódico. En un segundo punto cuando se disminuye el potencial y la corriente faradaica está presente, las tasas de cambio serán proporcionales entre sí para ambas especies, pero esta vez no serán igual a cero porque ya está ocurriendo la reducción, por lo tanto, se apreciará como la concentración de O_2 disminuye

y la de $O_2^{\bullet-}$ aumenta. Siguiendo con el barrido se encuentra el punto en el que el potencial de electrodo es igual al potencial formal, en el cual las concentraciones de O_2 y $O_2^{\bullet-}$ son iguales si γ es igual a uno. Existe un mayor agotamiento de O_2 y formación de $O_2^{\bullet-}$. Después, en el pico catódico, la corriente está controlada por difusión a diferencia de los puntos anteriores en donde la cinética de transferencia electrónica controlaba la respuesta, O_2 se sigue agotando y $O_2^{\bullet-}$ se acumula. En el siguiente punto, punto de inversión del potencial, la concentración de O_2 se ha vuelto prácticamente cero, mientras que la de $O_2^{\bullet-}$ ha alcanzado su máximo, recordando lo que se mencionó en la [Sección 6.1](#), la capa de difusión de Nernst sigue creciendo y la difusión de O_2 hacia el electrodo se ralentiza. Posteriormente en el barrido anódico al alcanzar de nuevo el potencial formal, los perfiles de concentración muestran un mínimo para el O_2 y un máximo para el $O_2^{\bullet-}$, lo que quiere decir que las concentraciones respectivas están recuperando su valor original. Nuevamente los flujos de ambas especies en este punto son iguales. En el pico anódico la concentración de O_2 aumenta tendiendo a su valor original (0.25 mM) y la de $O_2^{\bullet-}$ se agota tendiendo a cero. Finalmente, al regresar al potencial de inicio $E = 0$, la concentración de oxígeno prácticamente ha recuperado su valor original y la de superóxido ahora es cero. La representación de todos los cambios en función de la distancia se muestran de manera resumida en la [Figura 6.12a](#) una vez que se ha completado el ciclo.

De manera análoga pero esta vez en presencia de diferentes concentraciones de galato de propilo, se aprecian los perfiles de concentración de las demás especies. En estos casos el máximo de concentración de $O_2^{\bullet-}$ que se puede alcanzar es inferior que cuando PG estaba ausente, porque en el mecanismo de reacción se propone la formación de un aducto y la reacción con PG^- , lo que disminuye su concentración. En cambio, el mínimo que se alcanza para oxígeno es prácticamente el mismo para cualquier concentración de PG, posiblemente porque en el barrido catódico, antes de alcanzar el pico de reducción, las reacciones que se llevan a cabo son la formación y desintegración del aducto que en la [Subsección 6.1.3](#), se planteó la idea no contribuyen de manera significativa en la corriente de pico catódica y prácticamente la respuesta la da el oxígeno disuelto en la vecindad del electrodo. Por eso, la corriente catódica se mantiene aproximadamente constante. Sin em-

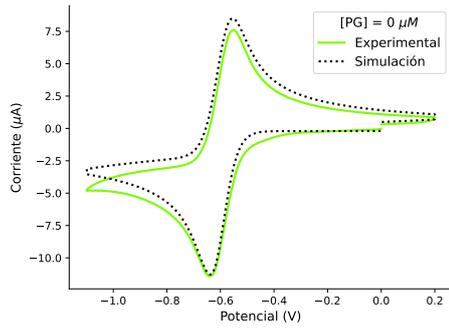
bargo, su concentración al final del experimento no es igual a 0.25 mM como en el caso anterior, porque parte del superóxido reaccionó con el PG^- y provocó que se formara menor cantidad de O_2 al invertir el barrido. Los perfiles de concentración de PG muestran cómo se fue incrementando su concentración inicial, además de cómo empieza a agotarse conforme el ciclo avanza hasta volverse prácticamente cero. Por otro lado, al inicio las concentraciones de PG^- (línea rosa) superpuesta con la de HO_2^\bullet (línea café, no se aprecia) son iguales a cero, pero crecen a medida que el experimento avanza de manera proporcional a la disminución de PG hasta alcanzar un valor constante.

6.1.5.2 Concentraciones superficiales en función del potencial

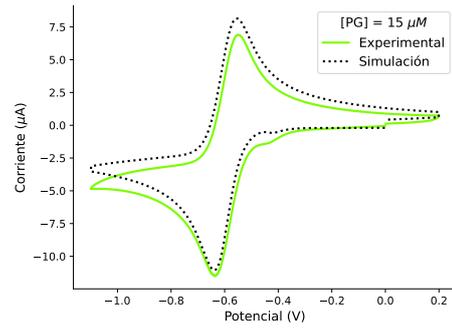
Las concentraciones superficiales en función del potencial (Figura 6.13) representan de manera equivalente a los gráficos anteriores cómo varían las concentraciones de cada una de las especies durante el barrido anódico y catódico. La configuración que tiene el eje x en las gráficas es un poco inusual, comienza a la izquierda en 0.0 V y termina a la derecha en 0.2 V, pero disminuye y aumenta en todo ese rango, estando como punto intermedio el potencial de inversión del voltamperograma igual a -1.1 V. Tomando esto en cuenta se puede entender cómo en la Figura 6.13a en el barrido catódico la concentración de oxígeno comienza siendo 0.25 mM y empieza a decaer a cero un poco antes de -0.58 V que es el potencial formal, a potenciales posteriores se mantiene en cero y empieza a crecer de nuevo cuando el potencial se aproxima a -0.58 V hasta volverse constante alcanzando su valor inicial. Contrario al perfil de concentración del O_2 está el del $\text{O}_2^{\bullet-}$ que empieza siendo cero en 0.0 V y en potenciales cercanos a -0.58 V comienza a crecer hasta aproximadamente 1.1 mM manteniéndose constante para después decrecer a cero en el segundo punto de -0.58 V.

La presencia de PG para los demás gráficos señala cómo se agota esta especie para cualquier concentración inicial hasta llegar a ser cero a potenciales cercanos a -0.4 V en el barrido catódico. Es importante mencionar que como participa en una reacción química (Ecuación 6.10) le impide regenerarse en el barrido anódico. De forma contraria ocurre la formación de PG^- y HO_2^\bullet , su concentración inicial es cero, pero conforme transcurre el barrido su concentración aumenta hasta ser constante

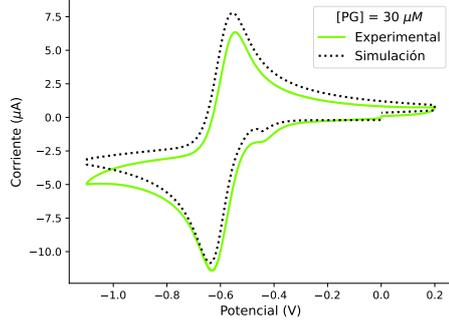
en el resto del experimento. Las concentraciones de O_2 y $O_2^{\bullet-}$ en estas situaciones han cambiado porque el superóxido reaccionó, lo que a su vez hizo que se formara menos oxígeno en el barrido anódico. A medida que aumenta la concentración de PG se puede observar como el máximo de concentración del $O_2^{\bullet-}$ va disminuyendo hasta ser aproximadamente 0.9 mM para la concentración 150 μ M de PG, con respecto al O_2 su concentración inicial en el barrido anódico es prácticamente la misma, pero al regenerarse en el barrido anódico no alcanza el máximo de 0.25 mM porque parte de $O_2^{\bullet-}$ reaccionó lo que impide que se restablezca la concentración inicial de O_2 en la oxidación.



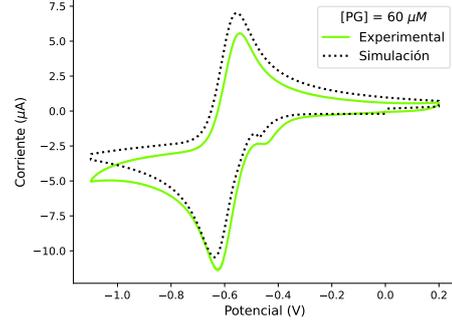
(a) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 0 \mu\text{mol/L}$.



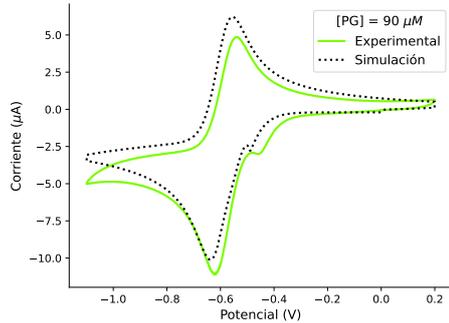
(b) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 15 \mu\text{mol/L}$.



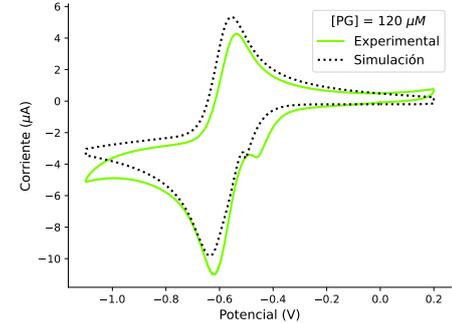
(c) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 30 \mu\text{mol/L}$.



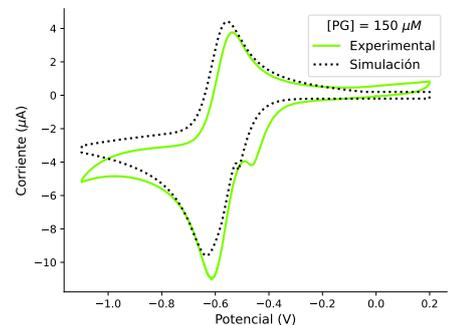
(d) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 60 \mu\text{mol/L}$.



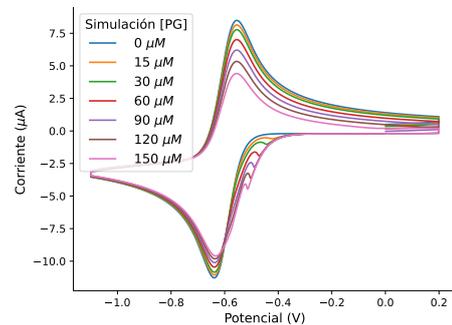
(e) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 90 \mu\text{mol/L}$.



(f) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 120 \mu\text{mol/L}$.

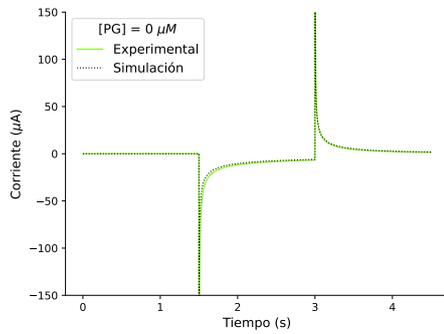


(g) Voltamperograma cíclico de la simulación y experimental. $[PG] = 150 \mu\text{mol/L}$.

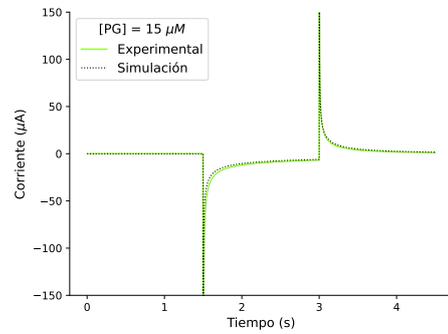


(h) Representación de solo los voltamperogramas simulados a diferentes concentraciones de PG.

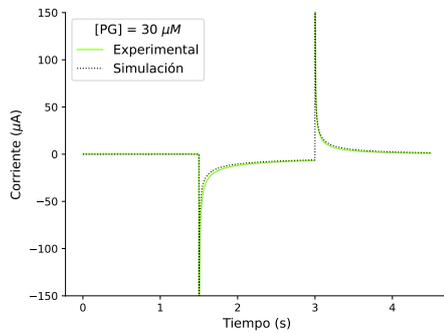
Figura 6.8. Resultados de la simulación en voltamperometría cíclica de los experimentos con adiciones de la disolución 15 mmol/L de PG.



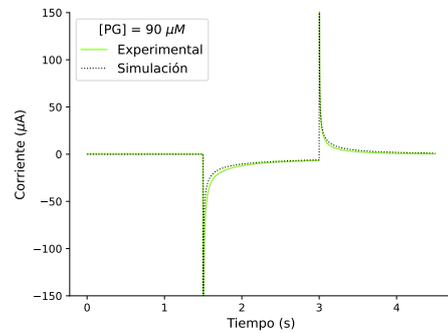
(a) Cronoamperograma de doble pulso de la simulación y experimental. $[PG] = 0 \mu\text{mol/L}$.



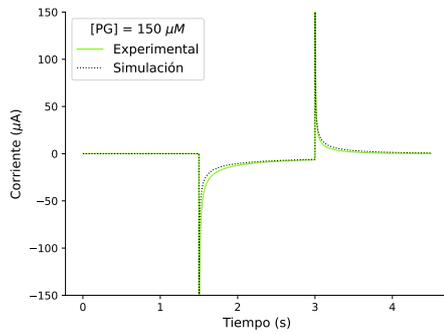
(b) Cronoamperograma de doble pulso de la simulación y experimental. $[PG] = 15 \mu\text{mol/L}$.



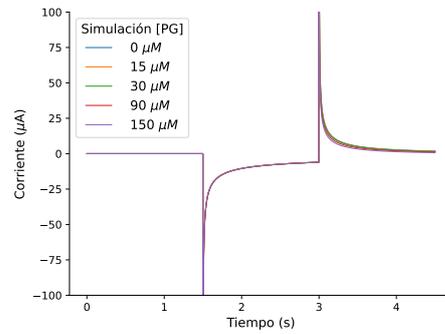
(c) Cronoamperograma de doble pulso de la simulación y experimental. $[PG] = 30 \mu\text{mol/L}$.



(d) Cronoamperograma de doble pulso de la simulación y experimental. $[PG] = 90 \mu\text{mol/L}$.

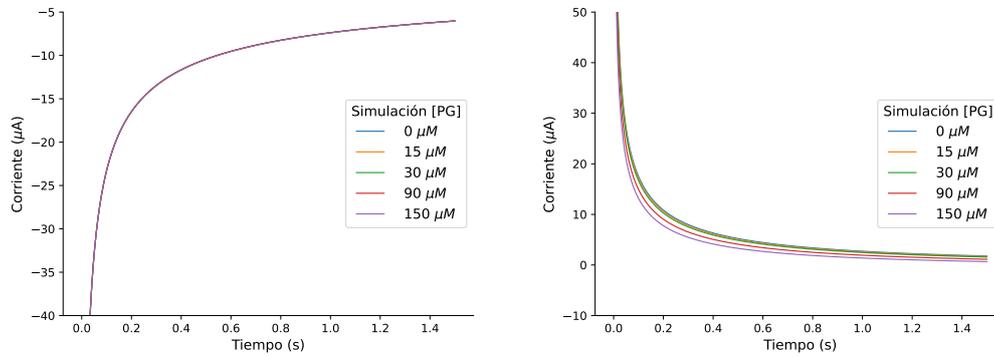


(e) Cronoamperograma de doble pulso de la simulación y experimental. $[PG] = 150 \mu\text{mol/L}$.



(f) Representación de solo los cronoamperogramas simulados a diferentes concentraciones de PG.

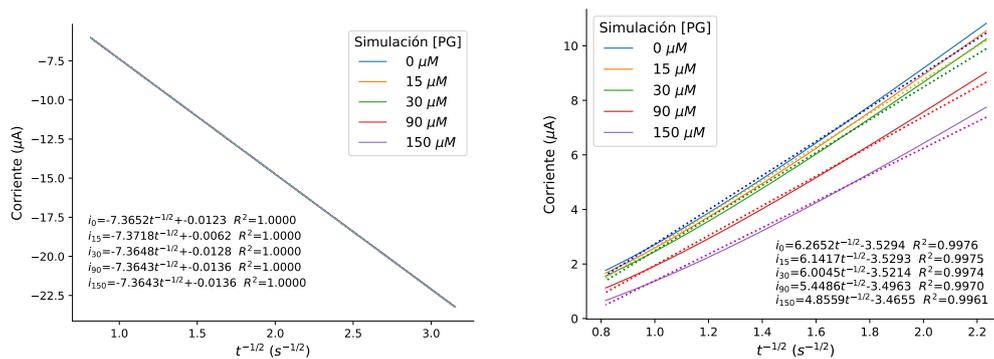
Figura 6.9. Resultados de la simulación en cronoamperometría de los experimentos con adiciones de la disolución 15 mmol/L de PG.



(a) Cronoamperogramas simulados de reducción para el par O_2/O_2^{*-} a diferentes concentraciones de PG.

(b) Cronoamperogramas simulados de oxidación para el par O_2/O_2^{*-} a diferentes concentraciones de PG.

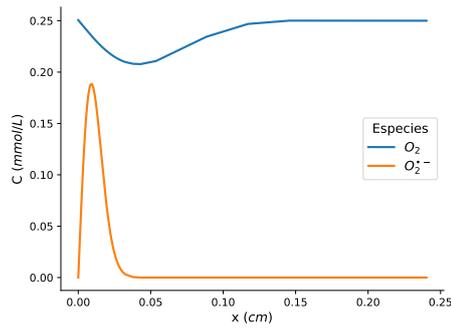
Figura 6.10. Cronoamperogramas de doble pulso de la simulación, separados en procesos de reducción y oxidación.



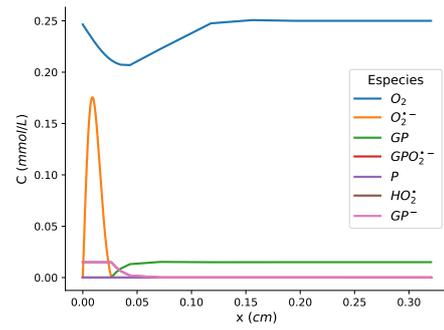
(a) Tratamiento de Cottrell para los cronoamperogramas simulados de reducción.

(b) Tratamiento de Cottrell para los cronoamperogramas simulados de oxidación.

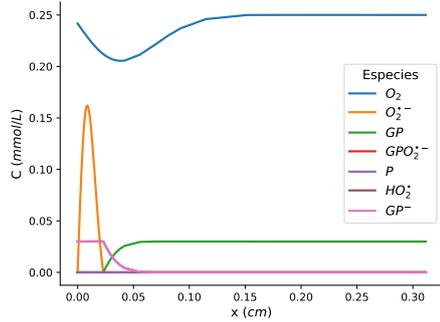
Figura 6.11. Resultados del tratamiento de Cottrell para los cronoamperogramas simulados.



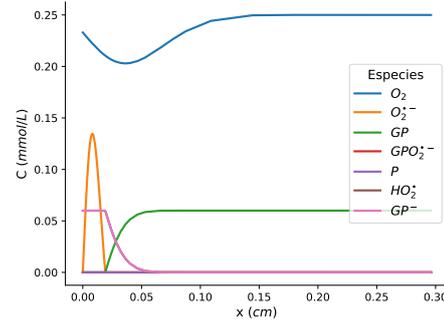
(a) Perfiles de concentración para $[PG] = 0 \mu\text{mol/L}$.



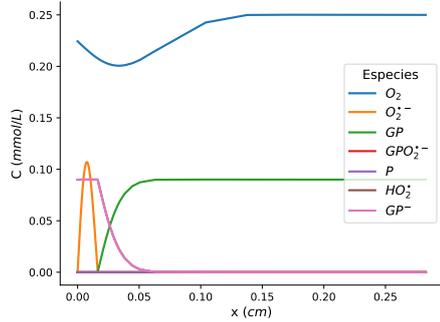
(b) Perfiles de concentración para $[PG] = 15 \mu\text{mol/L}$.



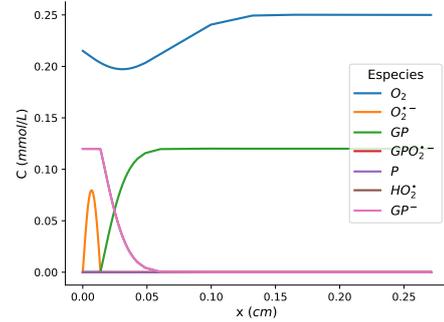
(c) Perfiles de concentración para $[PG] = 30 \mu\text{mol/L}$.



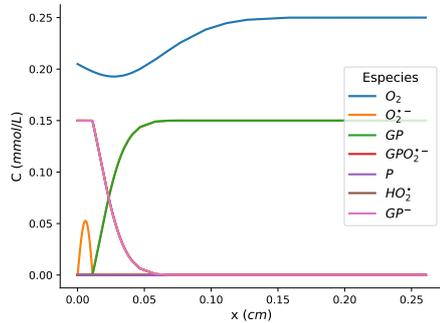
(d) Perfiles de concentración para $[PG] = 60 \mu\text{mol/L}$.



(e) Perfiles de concentración para $[PG] = 90 \mu\text{mol/L}$.



(f) Perfiles de concentración para $[PG] = 120 \mu\text{mol/L}$.



(g) Perfiles de concentración para $[PG] = 150 \mu\text{mol/L}$.

Figura 6.12. Perfiles de concentración en función de la distancia para cada una de las especies en el mecanismo de reacción al término de la simulación para las diferentes concentraciones de PG.

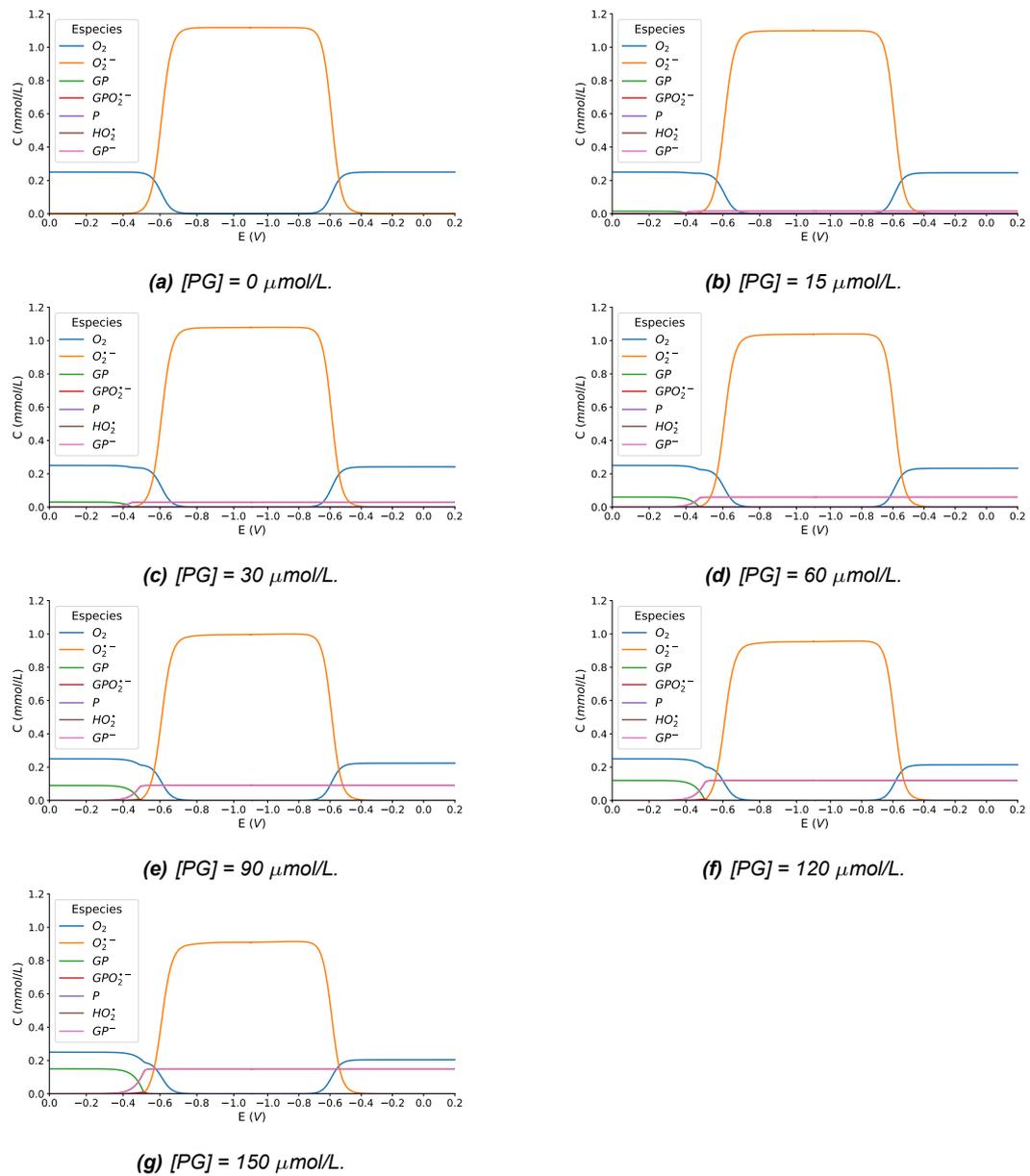


Figura 6.13. Concentraciones superficiales en función del potencial para cada una de las especies en el mecanismo de reacción al término de la simulación a diferentes concentraciones de PG.

CONCLUSIONES

- La reducción y oxidación del par oxígeno/superóxido, utilizando como electrolito TBAPF₆ en DMSO y un electrodo de trabajo de carbono vítreo, es un proceso cuasirreversible que además sirvió como referente en la limpieza del electrodo y preparación del electrolito para los posteriores experimentos.
- Se estudió la oxidación del galato de propilo mediante voltamperometría cíclica, de donde se encontró que el sistema en ausencia de O₂ es irreversible. Así también el número de electrones intercambiados (n=1) y el coeficiente de difusión ($D = 3.97 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$) se obtuvieron por voltamperometría y cronoamperometría utilizando un ultramicroelectrodo de platino.
- La reacción $O_2 + e^- \rightleftharpoons O_2^{\bullet-}$ en presencia de galato de propilo se vuelve químicamente irreversible debido a la reacción entre el anión superóxido y el PG⁻ con una constante k_f igual a $6.6048 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.
- Como herramienta útil para elucidar el mecanismo de reacción del antioxidante en presencia de oxígeno, el programa de simulación ayudó a proponer un mecanismo viable que representa en buena medida lo obtenido experimentalmente en voltamperometría y cronoamperometría. De esta simulación se pudo concluir que la reacción entre el galato de propilo y el ion superóxido se lleva a cabo mediante la formación de un aducto y la transferencia de protón. Además, los gráficos de los perfiles de concentración y de concentración superficial ayudaron a entender de una manera más clara cómo se modifican las concentraciones de las especies durante los experimentos.
- Como propuesta de trabajo a futuro se recomienda determinar la constante de transferencia de carga (k_s) de manera experimental. Al ser un sistema irreversible químicamente la dificultad para conocer este parámetro cinético crece significativamente. Así también se pueden hacer estudios para determinar la actividad/capacidad antioxidante del galato de propilo y comparar su efectividad frente a otros antioxidantes comúnmente utilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, S. (2016). *Introduction to reactive oxygen species: Emphasizing their importance in the male reproductive system*. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Ahmed, S., y Shakeel, F. (2012). Antioxidant activity coefficient, mechanism, and kinetics of different derivatives of flavones and flavanones towards superoxide radical. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 153-163.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., y Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (iupac technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 85, 957-998.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., y Çapanoğlu, E. (2016, 2). *Antioxidant activity/capacity measurement. 1. classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (et)-based assays* (Vol. 64). American Chemical Society.
- Bard, A. J., y Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* (2nd Edition ed.). Wiley.
- Becker, L. (2007). Final report on the amended safety assessment of propyl gallate. *International Journal of Toxicology*, 26, 89-118.
- Belmont-Bernal, F., Aguilar, J. C., Ramos, E., y Guadarrama, P. (2016, 10). Systematic derivatization of curcumin and its effect on antioxidant capacity and action mechanism. cyclic voltammetry and dft as tools of analysis. *Chemistry-Select*, 1, 5091-5098.
- Berg, J., Tymoczko, J., Gatto, G., y Stryer, L. (2015). *Oxidative phosphorylation* (Eighth ed.). W. H. Freeman and Company.
- Blasco, A. J., Rogerio, M. C., González, M. C., y Escarpa, A. (2005). Electrochemical index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539, 237-244.
- Blundell, R., Shah, M. A., Azzopardi, J. I., Iqbal, S., Ullah, M. S., y Rasool, S. (2022, 1). *Propyl gallate*. Elsevier.

- Bockris, J. O., y R, A. K. N. (2003). *Electroquímica moderna* (Vol. Volumen 1). Reverté.
- Brainina, K., Stozhko, N., y Vidrevich, M. (2019, 8). Antioxidants: Terminology, methods, and future considerations. *Antioxidants*, 8, 1-8.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., y Krause, K. H. (2012, 8). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142.
- Capanoglu, E., Kamiloglu, S., Cekic, S. D., Baskan, K. S., Avan, A. N., Uzunboy, S., y Apak, R. (2022). *Antioxidant activity and capacity measurement*. Springer.
- Chevion, S., Roberts, M. A., y Chevion, M. (2000, 3). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 860-870.
- Danet, A. F. (2021). *Recent advances in antioxidant capacity assays*. IntechOpen.
- EFSA. (2014, 4). Scientific opinion on the re-evaluation of propyl gallate (e 310) as a food additive. *EFSA Journal*, 12.
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., y Dempsey, J. L. (2018, 2). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95, 197-206.
- Feduchi, E., Romero, C., Yáñez, E., y García-Hoz, C. (2021). *Rutas centrales del metabolismo intermediario* (3a edición ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Finkel, T., y Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Girault, H. (2004). *Analytical and physical electrochemistry*. EPFL Press.
- Gonzaga, B. (2019). *Estudio electroquímico de la reacción del ion superóxido con [cu(fen)2]2+ en dmsó*.
- Gulcin, I. (2020, 3). *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview* (Vol. 94). Springer.
- Gunckel, S., Santander, P., Cordano, G., Ferreira, J., Munoz, S., Nunez-Vergara, L. J., y Squella, J. A. (1998). Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chemico-Biological Interactions*, 114, 45-59.

- Halliwell, B. (2006). *Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life* (Vol. 141). American Society of Plant Biologists.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Haque, M. A., Morozova, K., Ferrentino, G., y Scampicchio, M. (2021, 6). Electrochemical methods to evaluate the antioxidant activity and capacity of foods: A review. *Electroanalysis*, 33, 1419-1435.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., y AlNashef, I. M. (2016, 3). Superoxide ion: Generation and chemical implications. *Chemical Reviews*, 116, 3029-3085.
- Huheey, J., Keiter, E., y Keiter, R. (1997). *Modelos de química inorgánica: 2. el enlace covalente* (4a ed.). Harla.
- Inzelt, G. (2013, 1). *Pseudo-reference electrodes*. Springer Berlin Heidelberg.
- Jain, P. S. (1982). Electrolytic reduction of oxygen at solid electrodes in aprotic solvents—the superoxide ion. *Electrochimica Acta*, 27, 759-763.
- Kahlert, H. (2010). *Reference electrodes*. Springer Berlin Heidelberg.
- Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., y Luthria, D. L. (2022, 12). Oxidative stress and antioxidants—a critical review on in vitro antioxidant assays. *Antioxidants*, 11, 1-30.
- LI, Q. (2014). *Electrochemical reduction of oxygen* .
- Maricle, D. L., y Hodgson, W. G. (1965). Reduction of oxygen to superoxide anion in aprotic solvents. *Analytical Chemistry*, 37, 1562-1565.
- Medina, M. E., Iuga, C., y Alvarez-Idaboy, J. R. (2013, 7). Antioxidant activity of propyl gallate in aqueous and lipid media: a theoretical study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 13137-13146.
- Nordberg, J., y Arnér, E. S. (2001, 12). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.
- Oroian, M., y Escriche, I. (2015, 8). *Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis* (Vol. 74). Elsevier Ltd.

- Pisoschi, A. M., y Pop, A. (2015, 4). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- René, A., Abasq, M. L., Hauchard, D., y Hapiot, P. (2010, 10). How do phenolic compounds react toward superoxide ion? a simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. *Analytical Chemistry*, 82, 8703-8710.
- Sawyer, D. (1991). *Oxygen chemistry* (Vol. 26). Oxford University Press.
- Sawyer, D., y Roberts, J. (1966). Electrochemistry of oxygen and superoxide ion in dimethylsulfoxide at platinum, gold and mercury electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 12, 90-101.
- Sawyer, D. T., Chlericato, G., Angells, C. T., Nanni, E. J., y Tsuchiya, T. (1982). Effects of media and electrode materials on the electrochemical reduction of dioxygen. *Analytical Chemistry*, 54, 1720-1724.
- Shahidi, F., y Ambigaipalan, P. (2015, 10). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – a review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Sochor, J., Dobes, J., Krystofova, O., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Pohanka, M., ... Kizek, R. (2013). Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. *Int. J. Electrochem. Sci*, 8, 8464-8489.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Vasudevan, D., y Wendt, H. (1995, 7). Electroreduction of oxygen in aprotic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 392, 69-74.
- Villamena, F. A. (2013). *Molecular basis of oxidative stress: chemistry, mechanisms, and disease pathogenesis*. John Wiley & Sons.
- Voet, D., Voet, J. G., y Pratt, C. W. (2016). *Transporte de electrones y fosforilación oxidativa* (4a edición ed.). Editorial Médica Panamericana.

Xiao, F., Xu, T., Lu, B., y Liu, R. (2020, 3). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1, 60-69.

Yin, M., y O'Neill, L. A. (2021, 12). The role of the electron transport chain in immunity. *FASEB Journal*.

Zanello, P. (2003). *Inorganic electrochemistry : theory, practice and applications*. Royal Society of Chemistry.

ANEXO

ANEXO A: ELECTRODO DE PSEUDO-REFERENCIA

Un electrodo de pseudo-referencia se distingue de los electrodos de referencia convencionales, también conocidos como verdaderos o reales (Clase 0, 1, 2 y 3), porque en el primero no se alcanza un equilibrio termodinámico, debido a que no existe un ion común entre los conductores iónico y electrónico. El uso de este tipo de electrodos es recomendable en disolventes no acuosos o líquidos iónicos porque utilizar electrodos de referencia reales conlleva la contaminación del electrolito soporte con moléculas o iones indeseables, además que el disolvente con el que se construyen es comúnmente agua. Debido a que no se alcanza el equilibrio termodinámico, no se puede calcular el potencial del electrodo, por lo tanto, es necesario utilizar un par redox de referencia cuyo potencial formal o estándar sea conocido y estable en diferentes disolventes (ferroceno/ferricinio o cobaltoceno/cobalticinio) para después relacionar los potenciales de las especies estudiadas con este par o bien utilizar un electrodo de referencia convencional para medir su potencial. Una ventaja de este tipo de electrodos es que disminuyen la impedancia del sistema al no existir un puente salino además que el potencial de unión líquida es mínimo (Bard y Faulkner, 2001; Inzelt, 2013; Kahlert, 2010).