

00577



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“ ELECTROQUIMICA ANALITICA DE
SISTEMAS ENZIMATICOS: CATALASA Y
SUPEROXIDO-DISMUTASA ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(QUIMICA ANALITICA)

P R E S E N T A :

JOSE DE JESUS GARCIA VALDES



CIUDAD UNIVERSITARIA 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Contenido

| | | | |
|---|-----|--|----|
| Simbología..... | i | 2.4.3 Comportamiento de $ES+O_2$ | 17 |
| Abreviaturas..... | ii | 2.4.4 Comportamiento de $ES+O_2+Enz.$ | 18 |
| Resumen..... | iii | 2.4.5 Cálculo de la constante de dismutación "condicional"..... | 19 |
| Capítulo I: INTRODUCCION..... | 1 | 2.4.5.1 Método de Koutecky (1)..... | 19 |
| 1.1 Introducción..... | 2 | 2.4.5.2 Método de Koutecky (2)..... | 20 |
| Capítulo II: ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LA ENZIMA CATALASA..... | 3 | 2.4.5.3 Método de Kern & Orleman..... | 21 |
| 2.1 Antecedentes..... | 4 | 2.5 Voltamperometría de barrido lineal de potencial..... | 23 |
| 2.2 Cronocoulombimetría de pulso inverso..... | 6 | 2.5.1 Marco teórico..... | 23 |
| 2.2.1 Marco teórico..... | 6 | 2.5.2 Condiciones de medida..... | 23 |
| 2.2.2 Determinación de condiciones de medida..... | 6 | 2.5.3 Comportamiento de $ES+O_2$ | 24 |
| 2.2.3 Comportamiento del electrolito soporte (ES)..... | 8 | 2.5.4 Comportamiento de $ES+O_2+Enz.$ | 25 |
| 2.2.4 Comportamiento de ES en presencia de O_2 | 10 | 2.5.5 Cálculo de la constante "condicional"..... | 26 |
| 2.2.5 Comportamiento de la catalasa en ES. ($Enz+CS$)..... | 11 | Capítulo III: ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LA ENZIMA SUPEROXIDO-DISMUTASA..... | 28 |
| 2.2.6 Comportamiento de la disolución de $ES+O_2+Enz.$ | 11 | 3.1 Antecedentes..... | 29 |
| 2.2.7 Comportamiento de H_2O_2 en ES..... | 12 | 3.2 Cronocoulombimetría de pulso inverso..... | 31 |
| 2.3 Tensametría..... | 13 | 3.2.1 Marco teórico..... | 31 |
| 2.3.1 Marco teórico..... | 13 | 3.2.2 Condiciones de medida..... | 31 |
| 2.3.2 Condiciones de medida..... | 13 | 3.2.3 Comportamiento de ES..... | 31 |
| 2.3.3 Comportamiento de la catalasa: ($ES+Enz$)..... | 13 | 2.2.4 Comportamiento de $ES+O_2$ | 33 |
| 2.3.4 Comportamiento de $ES+O_2+Enz.$ | 14 | 2.2.5 Comportamiento de $ES+Enz.$ | 34 |
| 2.4 Polarografía clásica..... | 17 | 2.2.6 Comportamiento de $ES+O_2+Enz.$ | 35 |
| 2.4.1 Marco teórico..... | 17 | 3.3 Tensametría..... | 36 |
| 2.4.2 Condiciones de medida..... | 17 | 3.3.1 Marco teórico..... | 36 |
| | | 3.3.2 Condiciones de medida..... | 36 |
| | | 3.3.3 Comportamiento de $ES+O_2+Enz.$ | 36 |

| | | | |
|---|----|---|----|
| 3.4 Voltamperometría de barrido lineal de potencial..... | 39 | ANEXOS..... | 48 |
| 3.4.1 Marco teórico..... | 39 | A Parte experimental..... | 48 |
| 3.4.2 Condiciones de medida..... | 39 | B.0 Técnicas electroanalíticas..... | 50 |
| 3.3.3 Comportamiento de $ES+O_2$ | 39 | B.1 Polarografía clásica..... | 50 |
| 3.3.4 Comportamiento de $ES+O_2+Enz.$ | 40 | B.2 Cronocoulometría de pulso inverso..... | 51 |
| Capítulo IV: CONCLUSIONES..... | 42 | B.3 Voltamperometría de barrido lineal de potencial..... | 53 |
| 4.1 Conclusiones del capítulo I..... | 42 | B.4 Tensometría..... | 55 |
| 4.2 Conclusiones del capítulo II..... | 42 | B.5 Ecuaciones diferenciales..... | 57 |
| 4.3 Bibliografía..... | 44 | | |

Simbología.

| símbolo | significado | unidades | símbolo | significado | unidades |
|--------------------|---|------------------------|----------------|--|----------|
| A | área | cm ² | i _p | corriente de pico | μA |
| C | concentración | M, mol/cm ³ | i _t | corriente total | μA |
| C* | concentración en el seno de la disolución | M, mol/cm ³ | K | constante de reacción | variable |
| C _(t=0) | concentración en la interfase electródica | M, mol/cm ³ | k ⁰ | constante estándar heterogénea | cm/s |
| D | coeficiente de difusión | cm ² /s | m | flujo de mercurio | mg/s |
| E | potencial | V,mV | n | número de electrones | |
| E' | potencial condicional | V,mV | n _α | # de electrones en el paso más lento | |
| ΔE | diferencia de potencial | V,mV | O | oxidante, forma oxidada del sistema O + ne == R | |
| E _{op} | potencial de preconcentración | V,mV | Q _c | carga total transferida a t=τ en cronocoulombimetría | C, μC |
| E _f | potencial final | V,mV | Q _d | carga total transferida en la carga de doble capa | C, μC |
| E _i | potencial inicial | V,mV | Q _f | carga transferida en pulso directo en cronocoulombimetría | C, μC |
| E _p | potencial de pico | V,mV | Q _r | carga total transferida en el pulso inverso en cronocoulombimetría | C, μC |
| E _{p/2} | potencial de pico medio | V,mV | R | forma reducida del sistema O + ne == R | |
| F | constante de Faraday | C | t | tiempo; | s |
| i | corriente | μA | t ₁ | tiempo de vida media | |
| i _{ads} | corriente de pico de adsorción | μA | t ₂ | tiempo de preconcentración | s |
| i _d | corriente límite de difusión | μA | t _r | tiempo de reposo: sin aplicación de potencial y sin agitación | |
| i _k | corriente catalítica | μA | v | velocidad de barrido de potencial | V/s |

Simbología.

(continuación).

| símbolo | significado | unidades | símbolo | significado | unidades |
|-----------|---|---------------------|----------|--|------------------|
| α | coeficiente de transferencia | | θ | $\tau^{1/2} + (1-\tau)^{1/2} - 1/2$ | s ^{1/2} |
| Γ | exceso superficial | mol/cm ² | μ | espesor de la capa de reacción | cm |
| λ | parámetro cinético homogéneo adimensional | | τ | tiempo de pulso directo en cronocoulombimetría | s |

Abreviaturas

| Abrev. | Significado | Abrev. | Significado |
|--------|--|------------|---|
| CC | cronocoulombimetría | ET | electrodo de trabajo |
| DMF | dimetilformamida | MeCN | acetonitrilo |
| DMSO | dimetilsulfóxido | Py | piridina |
| EA | electrodo auxiliar | Q_{sup1} | carga de exceso superficial del pulso directo |
| EGM | electrodo gateante de mercurio | Q_{sup2} | carga de exceso superficial del pulso inverso |
| EGSM | electrodo de gota suspendida de mercurio | RMNF | resonancia magnética nuclear de fluoruro |
| Enz | enzima | SOD | superóxido dismutasa |
| EPM | electrodo de poza de mercurio | STEA | superóxido de tetra etil amonio |
| ER | electrodo de referencia | UV-Vis | espectrofotometría UV-Vis |
| ERP | espectroscopia de resonancia paramagnética | VL | voltamperometría de barrido de potencial lineal |
| ES | electrolito soporte | | |

Resumen:

En este trabajo se presenta el estudio cronocoulométrico para el sistema: electrolito soporte ($H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$) /oxígeno/enzima, para las condiciones de pH=7.0 y 7.8. En este estudio se demuestra la adsorción de los diferentes componentes del sistema en estudio: HPO_4^{2-} , oxígeno, peróxido de hidrógeno y enzima (catalasa y superóxido-dismutasa).

La adsorción tanto de oxígeno como de enzima se confirma por estudios de tensametría.

Posteriormente se realiza una estimación de la constante de velocidad "condicional" de la enzima catalasa; por medio de estudios de polarografía clásica y voltamperometría lineal. Esta constante de velocidad se caracteriza por un efectivo control de las condiciones de medida para minimizar, en lo posible, los efectos adsorptivos.

Para el estudio de la superóxido-dismutasa sólo se llevaron a cabo experimentos de voltamperometría lineal y se realizó una estimación muy gruesa del valor de la constante "condicional" de dismutación ya que los fenómenos adsorptivos son tan intensos, que no permiten un estudio más completo.

Abstract:

Chronocoulometric studies are presented in this work for the system: support electrolyte ($H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$) /oxygen/enzyme fixing pH in values 7.0 and 7.8 as reactional media. In This studies adsorption of the different components of the system are shown: HPO_4^{2-} , oxygen, hydrogen peroxyde and enzyme (catalase and dismutase-superoxide).

Tensametric studies are presented to confirm oxygen and enzyme adsorption.

In a second part of the work it is stimated the "conditional" kinetic constant of the enzyme catalase by means of classic polarography and linear voltammetry techniques. The kinetic constant found is characterized by a rigorous control of electrochemical measurements to minimize adsorptive effects.

As to the dismutase-superoxide, they were only performed experiments of linear voltammetry to make a gross estimation of the "conditional" kinetic constant since adsorptive effects are too strong to pretend performe a further complete study.

CAPITULO I:

INTRODUCCION

1.0 Introducción.

El interés de los científicos hacia la investigación multidisciplinaria es cada día una necesidad mayor, el estudio de los procesos químicos que se llevan a cabo en el interior de los seres vivos es de los aspectos más importantes, sin duda la cadena respiratoria ocupa un lugar preponderante. La respiración es fundamental para la obtención de energía.

El oxígeno es una molécula esencial para la vida^{1,2}, ya que su reducción produce energía para que se lleven a cabo los procesos vitales. El mecanismo exacto de la reducción del oxígeno ha sido ampliamente estudiado; no hay evidencia de que existan etapas de reducción de cuatro o dos electrones como lo sugieren algunas expresiones redox³. Las etapas de reducción son: de oxígeno a: O_2^- , H_2O_2 , $H_2O_2^-$ y H_2O . Los dos primeros intermediarios en exceso son tóxicos y por lo tanto deben ser eliminados⁴⁻⁶. El mecanismo mediante el cual son desechados de la célula considera las reacciones de dismutación de O_2^- y H_2O_2 , las cuales son favorecidas por la acción de enzimas: superóxido-dismutasa y catalasa, entre otras. La catalasa actúa sobre la molécula de H_2O_2 transformándola en H_2O y O_2 .

Es necesaria la total comprensión de la descomposición de los agentes tóxicos o protectores, pero debido a la rapidez de la descomposición, estudiarla sólo es posible con técnicas especialmente apropiadas. La electroquímica analítica es una de las metodologías con propiedades de sistema de monitoreo, medida y caracterización capaz de proporcionar una mayor información.

En el caso del estudio enzimático es necesario conocer perfectamente la interfase electrodo disolución para la total comprensión de los eventos y para decidir si los resultados que se pretenden obtener son válidos.

En este trabajo se pretende poner en evidencia los procesos de adsorción, que se presentan en mediciones con enzimas y la influencia que estos procesos tienen en la determinación de constantes de reacción de dismutación catalizada por la presencia de enzimas.

Para lograr estos objetivos, en primer lugar se estudia el sistema O_2 /enzima catalasa/solución amortiguadora de fosfatos pH=7.0, utilizando las técnicas de cronocoulombimetría de pulso inverso, tensametría, polarografía y voltamperometría lineal, todas ellas con diferentes tiempos ventana.

El estudio de la superóxido-dismutasa, se lleva a cabo a un pH=7.8 y comprende las mismas técnicas excepto a la polarografía por tener características que no nos permitieron trabajar con ella.

CAPITULO II:

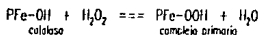
ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE

LA ENZIMA CATALASA

2.0 ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LA ENZIMA CATALASA.

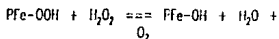
2.1 Antecedentes.

El mecanismo de acción de la catalasa para la descomposición del peróxido de hidrógeno es por vía catalítica o peroxidativa. En ambos mecanismos el primer paso es la formación de un complejo primario entre el H_2O_2 y el hierro (III) del grupo prostético^{12,13}. Reacción de complejo primario:

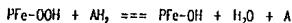


El valor de vida media para el complejo primario es de aproximadamente 8 milisegundos y el valor de la constante cinética de velocidad es de $3E+7$ [$l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$] según datos publicados por Chance¹².

a) El complejo primario reacciona con una segunda molécula de H_2O_2 en la descomposición catalítica según:



b) Si la descomposición se efectuó por la acción de un donador hipotético de hidrógeno interno de la apo-proteína, o por la de un donador externo, la reacción es peroxidativa:



La reacción catalítica debe ser siempre más rápida que la peroxidativa. Para asegurarse de esto, es necesario trabajar con concentraciones de sustrato igual o mayores que 10^{-4} M. Es

importante señalar que la enzima se inhibe por: elevada concentración de sustrato, degradación de núcleos hemáticos y tiempos largos de medición.

La catalasa se encuentra en el interior de las células aerobias y está formada por una estructura de cuatro sub-unidades⁷ de grupos prostéticos⁸. Contiene núcleos metálicos de hierro; algunos tipos de catalasa contienen además Cu y Mn en porcentaje muy pequeño^{9,10}. Según estudios de Sumner & Gralén¹¹ el coeficiente de difusión de la catalasa es de $4,7E-7$ cm^2/s y el peso molecular es aproximadamente de 240,000 g/mol. Tanford & Lovrien¹¹ determinaron, en 1962, la naturaleza de la enzima: globular, compacta y escasamente solvada; con un radio de Stokes de 52 angstroms. Debido a su gran tamaño, presenta baja solubilidad en el electrolito soporte aproximadamente de 0,208 micromolar.

Para determinar el mecanismo de reacción y actividad de la catalasa, se requieren condiciones especiales de medida^{10,17}. Por su gran rapidez, mediana desactivación y baja solubilidad, es necesario contar con metodologías apropiadas para ella. Se han utilizado, entre otras, la espectrofotometría de barrido rápido (stopped-flow), resonancia, radiálisis de pulsos y electroquímica¹⁸⁻²⁰. La electroquímica analítica es útil ya que tanto el sustrato como el producto de la descomposición son electroactivos.

Algunos autores^{23,32} calcularon, por métodos electroquímicos, la constante de dismutación de peróxido en presencia de catalasa.

Koulecky³³ propone una ecuación con dependencia funcional entre la relación de corriente catalítica y de la corriente límite de difusión, con el parámetro $\gamma = k[Enz]$, para un sistema reaccional EC⁺ (reacción electroquímica-reacción química catalítica). Esta relación toma en cuenta la difusión esférica y el crecimiento de la gota en polarografía.

Koulecky y Brdicka²⁶ proponen una ecuación para determinar la constante de dismutación de peróxido por catalasa. Se basa en la consideración de formación de una capa de reacción, toma en cuenta el crecimiento de la gota de mercurio y semiregeneración de oxígeno. El intervalo de $[Enz]$ que utilizan es de: $0-6.63 \cdot 10^{-6} M$, y el valor de constante que reportan de: $1.7 \cdot 10^7$.

Rigo A. y Rolillo G.²⁹ utilizan el modelo de Koulecky & Brdicka e introducen un agente con propiedades superficiales muy intensas como lo es la trifenilfosfina TPPO, con el fin de "estabilizar" la interfase.

Saveant J. M. & Vianello E.³⁵ proponen una expresión para calcular la constante de reacción para un mecanismo de dismutación catalizada para un sistema electroquímico rápido, por voltamperometría lineal.

En esta parte del trabajo, se propone estudiar en primer lugar, la doble capa para comprobar la existencia de fenómenos interfaciales; segundo, deducir las mejores condiciones de medida para estudios con las otras técnicas electroanalíticas y tercero calcular la constante de velocidad de dismutación catalizada por la acción de la catalasa utilizando algunos modelos propuestos en las publicaciones anteriores.

2.2 Cronocoulombimetría de pulso inverso.

2.2.1 Marco teórico.

En los experimentos de cronocoulombimetría de pulso inverso (CC) se impone una perturbación de potencial como la que se muestra en la figura 2.2.1.1.a. El valor de potencial inicial (E_i) es constante en todos los experimentos, mientras que el potencial final (E_f) es variable. Este potencial (E_f) se impone durante un tiempo (τ), después del cual se cambia el potencial del electrodo a (E_i). La figura 2.2.1.1.b presenta la respuesta característica para un proceso limitado por la difusión.

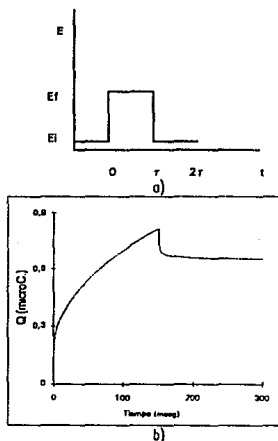


Fig 2.2.1.1 a) Programa de potencial impuesto en un experimento de CC. b) Respuesta característica para un proceso limitado por difusión. τ es el tiempo de perturbación. Q_c =cambios totales para el pulso directo.

La expresión que rige el experimento de cronocoulombimetría es conocida como ecuación de Cottrell integrada para el pulso directo e inverso para una especie electroactivo⁵¹:

$$Q_f(0 \leq t(\tau) = \left(\frac{2nFAD^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}} \right) \cdot \tau^{1/2} + Q_{dl} + nF\Delta\Gamma_1 \quad (2.2.1)$$

para el pulso inverso la expresión es la siguiente:

$$Q_i(\tau) = \left\{ \left[1 + \left(\frac{a_1 n F \Delta \Gamma_1}{Q_c} \right) \right] \left(\frac{2nFAD^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}} \right) \right\} \cdot \Theta + Q_{dl} + a_0 n F \Delta \Gamma_2 \quad (2.2.2)$$

donde Γ_1 y Γ_2 son los excesos superficiales de especies adsorbidas en el pulso directo e inverso respectivamente (Anexo B.2); Q_{dl} es la carga utilizada en la doble capa; $a_1 = c_{le} = 0.97$, $a_0 = c_{le} = -0.069$, $Q_c = Q(\tau)$;

$$\Theta = \tau^{1/2} + (t - \tau)^{1/2} - t^{1/2} \quad (2.2.3)$$

los demás símbolos tienen el significado habitual. (véase Simbología al inicio de este trabajo).

En cada una de las expresiones anteriores (2.2.1.1) y (2.2.1.2); existen términos que son independientes del tiempo y otros que no lo son. Con el objeto de separar las contribuciones de procesos difusionales e interfaciales en cada pulso; se realizan representaciones de Q_i vs $t^{1/2}$ y Q_i vs Θ . (Para ampliar un poco más revise Anexo B.2).

La ordenada al origen de cada recta es igual a $nF\Delta\Gamma_1 + Q_{dl}$ y $a_0 nF\Delta\Gamma_2 + Q_{dl}$; para el pulso directo e inverso respectivamente, que simbolizaremos por b_1 y b_2 respectivamente. La

pendiente de cada una de las rectas será m_1 y m_2 . La carga de utilizada en excesos superficiales: $nFA\Gamma$; , lo simbolizaremos como Q_{sup} .

A (τ) pequeños esta linealidad no es exacta, ya que las contribuciones adsorptivas y difusionales no se pueden diferenciar.

2.2.2 Determinación de condiciones de medida.

Para realizar un estudio cronocoulombimétrico es necesario primero definir el intervalo de potencial en que será realizado: inicial (E_i), final (E_f) y tiempo del pulso directo (τ). El trazo de voltamperogramas lineales previos es muy importante para definir dichos potenciales. La figura 2.2.2.1.a muestra el programa de potencial utilizado para efectuar experimentos de voltamperometría lineal en régimen de difusión pura.

En la figura 2.2.2.1.b se presenta la respuesta típica de dicho programa de potencial para el electrolito soporte (buffer de fosfatos $pH=7.0$, $0.1M$; representado como ES) saturado con oxígeno 0.206 mM en un electrodo de gota de mercurio suspendida (EGSM). Velocidad de barrido de potencial: 40 mV/s. La concentración de oxígeno, sin convección, se determinó con un electrodo selectivo de Clark.

El dominio de electroactividad en la solución buffer se encuentra aproximadamente entre 150 y -1600 mV, el potencial de corriente nula es de 100 mV con respecto al electrodo de referencia.

En la figura 2.2.2.1.b se observa la aparición de dos picos de reducción perfectamente separados entre sí. El primer proceso corresponde a la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno⁵¹ con potencial de pico (E_p) de -250 mV; el segundo, de peróxido de hidrógeno a agua ($E_p = -1210$ mV) se encuentra cerca de la barrera catódica. La corriente de pico para los dos reducciones es cercana a 0.6 μA .

En la primera reducción se produce H_2O_2 , sustrato, que en presencia de la enzima catalasa, genera un mecanismo de dismutación. Se realizó la evaluación del proceso de dismutación, en la primera reducción, por dos razones:

- está perfectamente definido el pico catódico a cualquier velocidad de barrido de potencial.

- sencillez de tratamiento del mecanismo electroquímico acoplado a una reacción catalítica (EC^*), comparado con (EC^E). Por lo tanto, los valores de Γ_i y E_i que se impondrán en cronocoulombimetría de pulso inverso (CC), estarán cercanos a la zona de la primera reducción (0 a -400 mV).

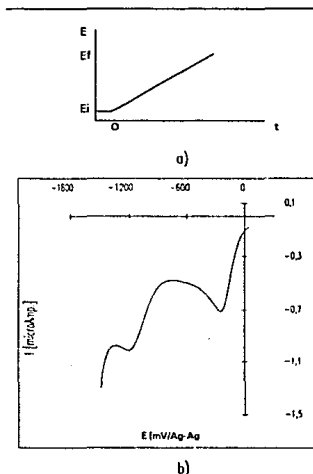


Fig 2.2.2.1 a) Programa de potencial impuesto al electrodo de gota suspendida de mercurio (EGSM).
b) Respuesta del sistema buffer de fosfatos $0.1M$ $pH=7$ y O_2 a solución.

Para caracterizar perfectamente el comportamiento del sistema se realizaron los siguientes experimentos:

- (1) -trazo de cronocoulogramas con pulso de -50, -100, -150, hasta -400 mV/Ag-AgCl para cada valor de τ (10, 20, 30, 40, 80 y 150 milisegundos) para una disolución que sólo contiene al ES en presencia de N_2 . Linealización de todas las curvas como en la figura 2.2.3.1.b Obtención por regresión lineal de los valores de ordenada al origen y pendiente de cada una de las rectas. Tabulación de valores.
- (2) Con el objeto de determinar si el oxígeno también se adsorbe en la interfase; se realizó la misma serie de experimentos de (1) para una disolución de ES saturado con oxígeno.
- (3) para cada concentración de enzima se aplicó el mismo procedimiento que (1) y en ausencia de O_2 . $[Enz]=0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8$ y $5.4nM$ (1)
- (4) Para conocer la respuesta del ES con oxígeno a saturación y para cada concentración de enzima se procedió de manera similar a (1), con cada una de las concentraciones de enzima citadas en (3).
- (5) Para estudiar de manera directa al peróxido de hidrógeno, se realizaron los experimentos como en (1), en presencia de H_2O_2 , con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8mM (sólo para $\tau=10$ y 150ms)

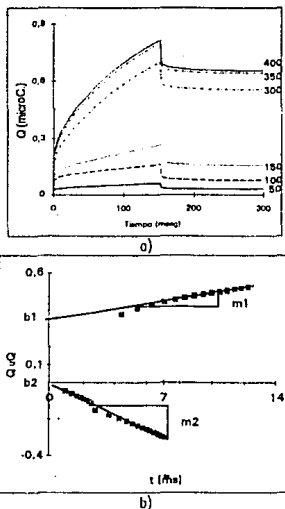


Fig 2.2.3.1 a) Cronocoulogramas para pulso directo e inverso de ES (ustafalato) (pH=7.0 0.1M), pulso variable y 150 ms. $\Delta E=50, 100, 150, 300, 350$ y $400mV$, marcados en la figura. b) linealización del pulso directo de la disolución de electrolito soporte y linealización del pulso inverso de la misma disolución.

2.2.3. Comportamiento del electrolito soporte.

En la figura 2.2.3.1 se muestra la respuesta característica para: electrolito soporte (ES); con tiempo de pulso (τ) de 150 milisegundos, pulso de potencial variable y en ausencia de oxígeno. La superficie de la gota en todos los experimentos es de $8.7E-3cm^2$.

Se puede hacer la siguiente observación importante: prácticamente todas las curvas experimentales obtenidas para Q vs $t^{1/2}$ y Q_r vs Θ son lineales. Si el electrolito soporte no se reduce en esa zona de potencial, entonces, alguna especie en concentración muy pequeña se reduce y se oxida y ésta parece estar limitada por difusión.

Puesto que es impráctico presentar todos los cronocoulogramas y rectas derivadas de ellas, para pulso directo e inverso, sólo se presentan los valores de $nFAT_1=0_{sup,1}$ y $nFAT_2=0_{sup,2}$; de las pendientes (m_1 y m_2). Los coeficientes de correlación lineal para cada una de las rectas (r_1 y r_2) no se anotan, sólo se indica en qué rectas $r < 0.99$. En la tabla 2.2.3.1 se anotan los valores de las respectivas pendientes y excesos superficiales del pulso directo e inverso para cada una de las líneas rectas. Es muy interesante mencionar que efectivamente para τ pequeños, el valor de r es inferior a 0.99 esto se debe a que

los efectos capacitivos y adsorptivos son más importantes que los difusionales; por lo que las ecuaciones 2.2.1.1 y 2.2.1.2 no describen exactamente los fenómenos que ocurren en el electrodo.

| τ | 10 milisegundos | | | | 20 milisegundos | | | |
|--------|-----------------|---------|-------|---------|-----------------|---------|-------|---------|
| | m_1 | nFA_1 | m_2 | nFA_2 | m_1 | nFA_1 | m_2 | nFA_2 |
| 0.050 | 31* | 90 | 50* | 66 | 33* | 91 | 37* | 93 |
| 0.100 | 204* | 167 | 215* | 85 | 183* | 239 | 210* | 139 |
| 0.150 | 458* | 470 | 623* | 48 | 393 | 749 | 537* | 83 |
| 0.200 | 813 | 577 | 1040 | -214 | 585* | 1248 | 872 | -169 |
| 0.250 | 1106* | 1214 | 1537* | -317 | 694 | 2416 | 1220 | -278 |
| 0.300 | 1178 | 2330 | 1891 | -367 | 583* | 3941 | 1426 | -746 |
| 0.350 | 949* | 3789 | 2156 | -412 | 463 | 5263 | 1562 | -728 |
| 0.400 | 803 | 4540 | 2324 | -420 | 472 | 6059 | 1703 | -720 |

| τ | 30 milisegundos | | | | 40 milisegundos | | | |
|--------|-----------------|---------|-------|---------|-----------------|---------|-------|---------|
| | m_1 | nFA_1 | m_2 | nFA_2 | m_1 | nFA_1 | m_2 | nFA_2 |
| 0.050 | 37 | 93 | 44 | 77 | 37 | 103 | 44 | 86 |
| 0.100 | 165 | 319 | 204 | 128 | 151 | 368 | 195 | 137 |
| 0.150 | 304 | 1075 | 475 | 92 | 757 | 1784 | 430 | 111 |
| 0.200 | 447 | 1789 | 760 | -134 | 363 | 2131 | 684 | -104 |
| 0.250 | 471 | 3103 | 1025 | -176 | 351 | 3690 | 902 | -141 |
| 0.300 | 366 | 4747 | 1181 | -167 | 268 | 5165 | 1031 | -114 |
| 0.350 | 306 | 5876 | 1304 | -124 | 250 | 6133 | 1129 | -43 |
| 0.400 | 297 | 6578 | 1404 | -83 | 241 | 6315 | 1220 | -11 |

| τ | 80 milisegundos | | | | 150 milisegundos | | | |
|--------|-----------------|---------|-------|---------|------------------|---------|-------|---------|
| | m_1 | nFA_1 | m_2 | nFA_2 | m_1 | nFA_1 | m_2 | nFA_2 |
| 0.050 | 35 | 126 | 43 | 87 | 34 | 153 | 43 | 95 |
| 0.100 | 119 | 378 | 169 | 150 | 94 | 776 | 117 | 153 |
| 0.150 | 174 | 1716 | 341 | 130 | 118 | 2012 | 216 | 119 |
| 0.200 | 223 | 2886 | 526 | -67 | 154 | 3376 | 478 | -84 |
| 0.250 | 174 | 4520 | 676 | -102 | 134 | 4284 | 524 | -92 |
| 0.300 | 163 | 5697 | 754 | -14 | 126 | 5904 | 582 | -9 |
| 0.350 | 164 | 6552 | 817 | 93 | 133 | 6643 | 611 | 177 |
| 0.400 | 170 | 7106 | 871 | 167 | 149 | 7227 | 648 | 279 |

Tabla 2.2.3.1. Pendientes y excesos superficiales de las líneas rectas obtenidas en el pulso directo e inverso de toda la serie de experimentos realizados. Todos los datos aquí presentados son líneas rectas y tienen un valor de coeficiente de correlación mayor a 0.99 calculado a partir del 80% de todos los puntos obtenidos en cada cronocoulograma. Los datos que están marcados con asterisco (*) presentan r menores de 0.99. $\rightarrow E^*$: potenciales relativos a Ag-AgCl.

Apartir de la tabla 2.2.3.1 y de la figura 2.2.2.1 se encuentra que:

• si $E_i > -250$ mV la reducción de oxígeno se encuentra limitado por la cinética de transferencia electrónica y por lo tanto las pendientes de la tabla, para todos τ , son diferentes; ya que no se cumple la ley de Cottrell.

• cuando $E_i < -250$ mV la reducción está limitada por la difusión, los valores de pendiente para los dos ΔE más catódicos de la tabla, son casi constantes a cualquier valor de τ ya que cumplen con la ley de Cottrell.

De esta comparación, se puede concluir que el oxígeno no fué eliminado totalmente de la disolución y por lo tanto gracias a ello se pudo obtener respuesta en CC para ES. En todos los casos, de la tabla 2.2.3.1, se puede observar que, para una ΔE^{**} fija, nFA_1 y nFA_2 son diferentes; esto indica la presencia de fenómenos de adsorción de las especies electroactivas.

Los excesos superficiales para el pulso directo a diferentes τ se muestran en la figura 2.2.3.2.a. Se observa que conforme el tiempo de pulso aumenta, el cálculo de exceso superficial varía en menor cantidad entre cada pulso. Esto podría indicar que a τ pequeños no se pueden aplicar correctamente las ecuaciones 2.2.1.1 y 2.2.1.2 como ya se mencionó anteriormente. El exceso superficial de acuerdo a estas ecuaciones corresponde a las especies electroactivas, en este caso al O_2 . La figura 2.3.2.2.a muestra que nFA_1 aumenta con $|\Delta E|$, tendiendo a un valor constante conforme E_i se hace más catódico. Se puede decir que existe la probabilidad de que se haya saturado la interfase de O_2 adsorbido específicamente.

Es posible calcular la carga debida a la doble capa Q_{dl} por diferencia entre las ordenadas al origen. La figura 2.3.2.2.b presenta las curvas de Q_{dl} vs ΔE . Se observa que todos ellos presentan un mínimo aproximadamente a -200 mV; que podría deberse a dos causas:

1) En este valor de potencial se lleva a cabo la transferencia electrónica (figura 2.2.2.1). Esto transferiría provocar que la estructura de la doble capa se modifique de manera importante. La

observación de este fenómeno nos certifica que el cálculo para Q_{dl} es correcto.

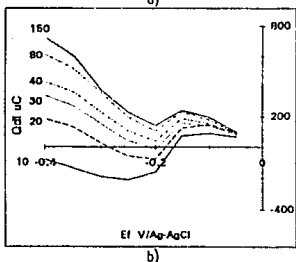
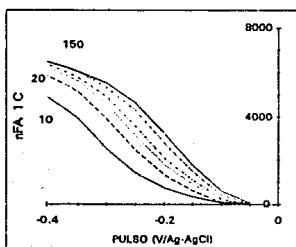


Fig. 2.2.3.2 Comportamiento de ES. a) Valores de nFA_1 calculados a partir de la ec. 2.3.1. a diferentes valores de τ . b) Representación de la carga de doble capa Q_{dl} para el ES a diferentes τ : 10, 20, 30, 40, 80 y 150 ms, los cuales están marcados en la figura.

2) El mínimo presentado en las curvas de Q_{dl} es característico para fenómenos de adsorción de especies cargadas no electroactivas; lo anterior viene a corroborar la adsorción de la especie HPO_4^{2-} ; observado por Zobel & Parsons⁷³.

De la misma figura 2.2.3.2.b se observa algo muy interesante: conforme el tiempo de pulso directo es mayor, la diferencia entre cada curva también se incrementa. Lo anterior se podría explicar, por el hecho siguiente: el cálculo de Q_{dl}

se realiza por medio de las ordenadas al origen del pulso directo e inverso. El tiempo de pulso es importante; ya que para tiempos mayores, los cambios son más importantes en la interfase; es decir la cantidad adsorbida de HPO_4^{2-} se incrementa. La diferencia en las curvas de esta figura, se hace más importante conforme ΔE se hace más catódico.

2.2.4. Comportamiento de ES en presencia de O_2 .

La figura 2.2.4.1 presenta las curvas cronocoulombimétricas típicas obtenidas a diferentes valores de pulso de potencial y a un valor fijo de $\tau=150$ ms para $ES+O_2$. En todos los casos analizados, Q vs $t^{1/2}$ y Q_i vs Θ para el pulso directo e inverso, respectivamente, son lineales. Solo se discuten las pendientes m_1 y m_2 , así como las ordenadas al origen b_1 y b_2 obtenidas en cada caso.

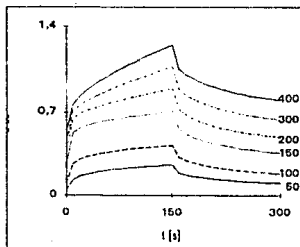


Fig. 2.2.4.1 Cronocoulogramas para pulso directo e inverso de la disolución de oxígeno a saturación en fosfatos (pH=7.0 0.1M), pulso variable y 150 ms. $\Delta E=50, 100, 150, 200, 300, 350$ y 400 mV, que se encuentran marcados en la figura.

En la figura 2.2.4.2 se presentan la variación de m_1 y m_2 para el pulso directo e inverso a $\tau=10, 80$ y 150 ms. Es importante hacer notar que la pendiente del pulso inverso es cercana a cero y

casi constante en todos los valores de ΔE ; lo que demuestra que no se oxidó la especie producida en la superficie electrodrítica (fig 2.2.4.1). Este proceso es lento (en nuestras condiciones de medida).

Nótese que la pendiente casi no aumentó para $\Delta E > 150\text{mV}$; indicando que prácticamente no existe reacción electroquímica. Para $350\text{mV} > \Delta E > 150\text{mV}$ la pendiente se incrementa de manera evidente, indicando que el proceso electroquímico, en esta zona de potencial, no se encuentra en el gradiente máximo de difusión; y por último casi se mantuvo constante después de 350mV , ya que se cumple la ecuación de Cottrell integrada (máximo gradiente de difusión).

Para el estudio de los excesos superficiales se analizaron los datos obtenidos en $\tau = 150\text{ms}$, ya que la cantidad de puntos experimentales es mayor.

| $(-\Delta E)$ V | m_1 | $nFA\Gamma_1$ | m_2 | $nFA\Gamma_2$ |
|--------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| | $\mu\text{C}/\text{mg}^{1/2}$ | μC | $\mu\text{C}/\text{mg}^{1/2}$ | μC |
| 50 | 27 | 248 | 0 | 310 |
| 0.100 | 41 | 533 | 7 | 521 |
| 0.150 | 68 | 751 | 14 | 728 |
| 0.200 | 150 | 775 | 18 | 748 |
| 0.250 | 391 | 890 | 20 | 800 |
| 0.300 | 484 | 1120 | 22 | 951 |
| 0.350 | 530 | 1509 | 28 | 1307 |
| 0.400 | 523 | 1738 | 31 | 1393 |

Tabla 2.2.1.1 valores de pendiente y ordenado (linealización) para pulso directo e inverso a diferentes valores de ΔE , $\tau = 150\text{ms}$ y mismas condiciones que la fig 2.2.1.1.

En la tabla 2.2.4.1 se presentan los valores de m y b para ambos pulsos a 150ms . Los valores de $nFA\Gamma_1$ y $nFA\Gamma_2$ se calcularon a partir de b_1 y b_2 (Tabla 2.2.4.1) y los valores de Q_d de la figura 2.2.3.2.b. La diferencia entre los valores obtenidos para $nFA\Gamma$ entre el pulso directo e

inverso, a un mismo E_r , indica que el oxígeno y su producto de reducción se adsorben específicamente. Se cree que la especie O_2 se adsorbe con mayor intensidad que el H_2O_2 .

De las tablas 2.2.3.1 y de 2.2.4.1 (para $\tau = 150\text{ms}$) se puede observar lo siguiente:

- m_1 para $ES+O_2 > ES$; que es evidente ya que el O_2 no se eliminó y por lo tanto su concentración es mayor.
- m_2 para $ES+O_2$ es casi constante debido a que la oxidación de peróxido de hidrógeno es lenta.
- $nFA\Gamma_1$ para $ES+O_2 < ES$; que se podría deber a la adsorción de especies del disolvente (HPO_4^{2-}) por la presencia de oxígeno, en el Plano Interno de Helmholtz (PIH).
- $nFA\Gamma_2$ para $ES+O_2 > ES$; debido al aumento en la concentración en la interfase de H_2O_2 .

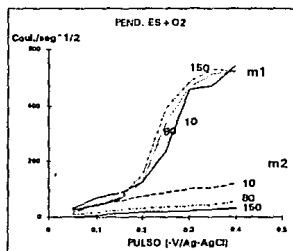


Fig 2.2.1.2 Curvas típicas de un proceso difusional en este se presentan los valores de pendiente m_1 y m_2 para la reducción de oxígeno a diferentes valores de $\tau = 10, 80$ y 150ms .

Se puede concluir que la presencia de oxígeno modifica la interfase electrodo/disolución y que la presencia de éste se verifica en los resultados obtenidos.

2.2.5. Comportamiento de la catalasa en ES.

En el caso de catalasa en ES, en ausencia y presencia de O_2 , también se obtienen las variaciones lineales de Q vs $t^{1/2}$ y Q_t vs Θ . Sólo se analizan los excesos superficiales y la pendiente.

La figura 2.2.5.1 muestra las curvas de exceso superficial vs tamaño de pulso a diferentes concentraciones de enzima (0, 1.2 y 5.4 nM). Se observa que $nFA\Gamma_1$ y $nFA\Gamma_2$ se modifican por la presencia de la enzima; que indica la adsorción de la catalasa. Existe una disminución en $nFA\Gamma$ conforme $[Enz]$ aumenta, y es más evidente para el pulso directo ($nFA\Gamma_1$).

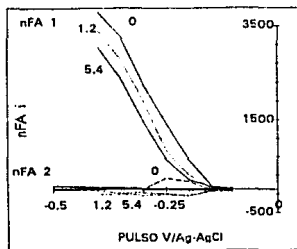


Fig. 2.2.5.1 Exceso superficial $nFA\Gamma_1$ y $nFA\Gamma_2$ de la enzima catalasa a: 0, 1.2 y 5.4 nM

2.2.6. Comportamiento de la disolución de $ES+O_2+Enz$.

La figura 2.2.6.1.a muestra la variación de m_1 y m_2 para el oxígeno en ausencia y presencia de catalasa. En ellas se evidencia el incremento de pendientes m_1 y m_2 en función de la cantidad de catalasa presente. Se comprobó que la presencia de enzima en una disolución saturada con oxígeno modifica la velocidad de transferencia de carga ya que cataliza la dismutación de

peróxido de hidrógeno, los valores de las constantes de los rectos de Q vs $t^{1/2}$ y de Q_t vs Θ , también se modifican. El valor de la pendiente m_1 , al igual que m_2 , casi se quintuplica por efecto de la catálisis. Para m_1 es lógico; Sin embargo para m_2 , no. Una posible explicación es que el complejo formado con $Enz-O_2$ se oxide a este valor de potencial.

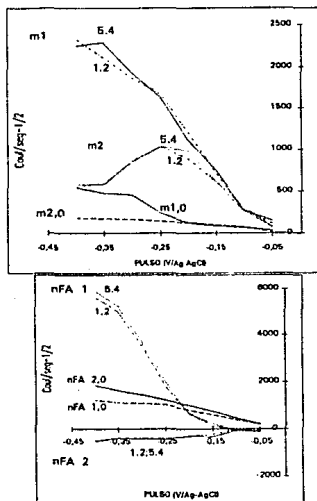


Fig. 2.2.6.1 a) Valores de pendiente m_1 y m_2 para la reducción de oxígeno a diferentes concentraciones de catalasa $[Enz]=0, 1.2$ y 5.4 nM

b) Valores de $nFA\Gamma_1$ y $nFA\Gamma_2$ a las mismas concentraciones.

En la figura 2.2.6.1.b se presenta una serie de mediciones de $nFA\Gamma_1$ y $nFA\Gamma_2$ a diferentes concentraciones y valores de pulso. Se observa que los valores de exceso superficial para $ES+O_2$

son muy parecidas cuando no existe enzima en solución. Cuando se agrega enzima, se modifican de manera importante. De la figura 2.2.5.1 y de 2.2.6.1.b; se deduce que la adsorción de especies es favorecida cuando el oxígeno se encuentra en disolución.

2.2.7. Compartamiento del H_2O_2 en ES.

Para comprobar si el peróxido de hidrógeno, se adsorbe al electrodo se realizó la misma serie de experimentos efectuados anteriormente con enzima. Las concentraciones son diferentes comparadas con el experimento en que hay enzima. Para los estudios de cronocoulombimetría de $ES+H_2O_2$; las representaciones de Q vs $t^{1/2}$ y Q , vs Θ son líneas rectas; sólo se analizan los excesos superficiales y las pendientes del pulso directo e inverso.

Los resultados demuestran que no hay reacción electroquímica del H_2O_2 pero si hay adsorción. La tabla 2.2.7.1 muestra los valores de exceso superficial.

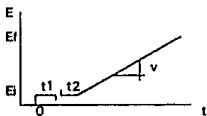
| I -(V) | 10ms | | 80ms | | 150ms | |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | ΔQ^+ | ΔQ^- | ΔQ^+ | ΔQ^- | ΔQ^+ | ΔQ^- |
| 0.050 | 130 | 141 | 148 | 191 | 149 | 211 |
| 0.100 | 366 | 295 | 357 | 318 | 359 | 327 |
| 0.150 | 654 | 513 | 559 | 461 | 509 | 456 |
| 0.200 | 1158 | 943 | 859 | 810 | 835 | 606 |
| 0.250 | 1474 | 1248 | 893 | 833 | 660 | 570 |
| 0.300 | 1640 | 1273 | 976 | 885 | 747 | 578 |
| 0.350 | 1765 | 1256 | 1111 | 781 | 914 | 712 |
| 0.400 | 1937 | 1330 | 1186 | 734 | 1010 | 665 |

Tabla 2.2.7.1 Valores de excesos superficiales para la reducción y oxidación de las especies adsorbidas específicamente al electrodo ($ES+H_2O_2$) $\tau = 10, 80$ y $150ms$.

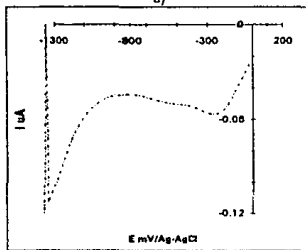
2.3 Tensametría.

2.3.1. Marco teórico.

Con el propósito de confirmar la existencia de fenómenos de adsorción en la interfase electrodo/disolución, mostrados en los experimentos de CC; se efectuaron diversos experimentos tensamétricos. La tensametría es una técnica con características y ventana de tiempo diferentes; que nos permite obtener información complementaria.



a)



b)

Fig 2.3.1.1 a) Programa de potencial impuesto para experimentos de tensametría.

b) Curvas tensamétricas para electrodo soporte en presencia de enzima catalasa [Enz] = 5.4 nM tiempo de preconcentración (t_1) variable = 0, 30, 60 y 90s. Tiempo de reposo constante de 15s. el sistema de electrodos: EA: platina; ER: Ag-AgCl y ET: EGSM. El E_{ap} es de 0mV

El principio de la tensametría es el de concentrar especies con actividad superficial, durante un tiempo t_1 (tiempo de preconcentración), mediante la aplicación de potencial E_{op} en régimen convectivo para luego detectar su presencia en la interfase. Ya que la voltamperometría lineal nos ayuda en este objetivo, es necesario la existencia de un tiempo de reposo t_2 para alcanzar la condición no convectiva. En el anexo B.4 se explica la manera como se realizan los experimentos de tensametría de manera más detallada. La figura 2.3.1.1.a muestra el programa de potencial aplicado a la interfase electrodo-disolución (EGSM-ES). La figura 2.3.1.1.b muestra la respuesta tensamétrica para ES+Enz a t_1 variable. El E_{ap} más anódico posible es de 0mV ya que corresponde a un potencial muy cercano al límite de oxidación.

2.3.2 Condiciones de medida.

Para poner de manifiesto la adsorción de enzima en la interfase se realizaron los siguientes experimentos:

- (1) En una disolución de ES, se aplicó el programa de potencial mostrado en la figura 2.3.1.1.a. Se realizó el estudio a lo largo de todo el dominio de electroactividad (aprox. 0 a -1400mV) con decrementos de 100mV, por lo que E_{op} es igual a: 0, -100, -200, ... y -1300. Para cada E_{op} se hicieron diferentes tiempos de concentración t_1 : 0, 30, 60 y 90 segundos. El tiempo de reposo fué de 15s constante. Entre cada medición se renovó la gota de mercurio (muy importante).
- (2) Todo lo anterior se lleva a cabo en una disolución de catalasa 5.4nM en ES; ésta concentración es del orden que se utilizó en cronocoulombimetría y de la que, posteriormente, se usa en voltamperometría y polarografía.

2.3.3 Comportamiento de la catalasa (ES+Enz).

En la figura 2.3.3.1.b se muestra un conjunto de curvas tensamétricas para $E_{ap}=0mV$ para $[Enz]=5.4nM$ y diferentes valores de t_1 . En ellas se observa el incremento de la corriente de pico en función de t_1 . El pico obtenido en las curvas tensamétricas no puede atribuirse a un proceso difusional ya que la concentración de catalasa es muy baja $5.4nM$, y por tanto, imposible que se detecte un pico difusional. Este pico de corriente se debe a un simple proceso difusional debido a la catalasa, ya que esta no presenta electroactividad en las condiciones operativas, además de que se encuentra en una muy pequeña concentración ($5.4nM$).

En la tabla 2.3.3.1 se presentan los valores de corriente de pico de adsorción a diferentes valores de potencial aplicado. Se encontró que la preconcentración es más importante a potenciales cercanos a $0mV$, así mismo, se incrementa con t_1 . El orden de incremento en i_p es el siguiente para E_{ap} : $0 > -100 > -200$ y $> -300mV$; en los demás potenciales es casi nula.

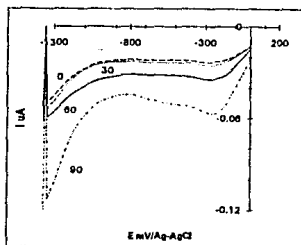


Fig. 2.3.3.1 Curvas tensamétricas para electrodo soporte en presencia de enzima catalasa $[Enz]=5.4 nM$ tiempo de preconcentración (t_1) variable=0, 30, 60 y 90s. Tiempo de reposo constante de 15s; el sistema de electrodos: EA: platina; ER: Ag-AgCl y ET: ECSM.

El pico obtenido en los experimentos de tensometría de ES+Enz, indudablemente, es una consecuencia de la modificación de la interfase; sólo falta definir a que tipo de fenómeno y especie corresponde. Existen dos teorías que explican las posibles sucesos que se llevan en la interfase electrodiódica:

- El proceso de adsorción de la enzima se evidenció en la sección 2.2.5 (figura 2.2.5.1); por lo tanto, la corriente detectada se debe a una modificación de la capacitancia diferencial de la interfase Hg/solución, debido al cambio de especies químicas adsorbidas específicamente (curvas tensamétricas).

- De los experimentos de VI, se encontró que el dominio de electroactividad se encontraba limpio, es decir, no se detectaba la reducción del oxígeno cuando se burbujeó H_2 . De los experimentos de CC (figura 2.2.3.1), se dedujo que el oxígeno no se eliminó completamente y éste en presencia de enzima produce una respuesta mayor (figura 2.2.6.1). Al imponer el E_{ap} durante un t_1 , se logra la concentración tanto de la enzima como del mismo oxígeno. Es probable pensar que la corriente producida por el oxígeno se haya incrementado hasta hacerse visible (figura 2.3.3.1). Experimentos posteriores nos podrán ayudar para encontrar la respuesta.

| $-E$ mV | 0 | 100 | 200 | 300 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| t_1 | i_p | i_p | i_p | i_p |
| | nA | nA | nA | nA |
| 0s | 23 | 21.0 | 20.1 | 19.3 |
| 15s | 25 | 22.1 | 21.5 | 21.0 |
| 30s | 34 | 22.8 | 24.2 | 23.9 |
| 90s | 57 | 53.6 | 48.8 | 41.0 |

Tabla 2.3.3.1 Valores de corriente de pico correspondiente al proceso de adsorción/desorción de catalasa en la superficie de mercurio a diferentes valores de potencial y tiempo de preconcentración; concentración de enzima $5.4nM$.

2.3.4 Comportamiento de $ES+O_2+FHz$.

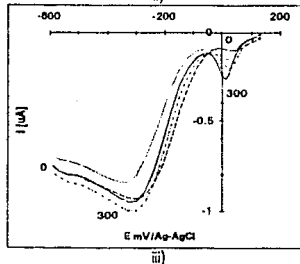
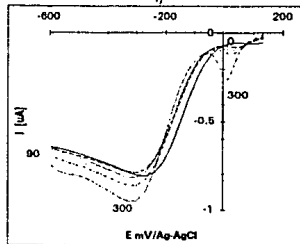
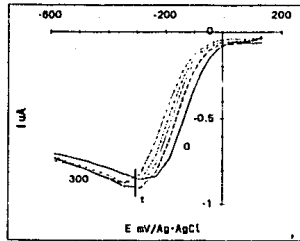
Con el fin de comprobar que los valores de t_p de la reducción de oxígeno se modifican, por la adsorción de enzima se realizó lo siguiente:

- En una disolución de ES que contiene oxígeno a saturación; se trazaron tres voltamperogramas lineales desde 150 hasta -600mV para conocer su respuesta promedio.
- Posteriormente, se agregó enzima hasta tener una concentración de 5.4nM. Se trazaron todos los tensametrías con $E_{op}=150mV$ y $t_2=15s$ constantes. Es importante hacer notar que E_{op} se fijó en este valor por dos razones: es el potencial a corriente nula (determinada por voltamperometría lineal) y así mismo, es un valor muy próximo al límite de oxidación, en presencia de oxígeno. Para evidenciar el aspecto de transporte de masa en una concentración "natural"; la preconcentración ($t_1=0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240$ y $300s$) se realizó también en condiciones de RDNE y sin imposición de potencial. (figura 2.4.3.1.i.)
- Para comprobar que la agitación de potencial es importante en el proceso de adsorción; se realizaron los mismos experimentos haciendo una concentración "natural" de la enzima (figura 2.4.3.1.ii)
- Finalmente se realizó el experimento con agitación durante t_1 , y con imposición de potencial, para cada uno de los tiempos indicados. (figura 2.4.3.1.iii)

Entonces, la preconcentración de la enzima se hizo:

- círculo cerrado sin agitación.
- círculo abierto con agitación.
- círculo cerrado con agitación.

2.4.3.1 Curvas tensamétricas para la reducción de oxígeno en presencia de enzima a diferentes tiempos de preconcentración (t_1 : 0, 30, 60, 90 y 300s; t_2 es de 15seg constante y el valor de potencial de preconcentración de 150mV/Ag-AgCl. Las curvas se realizaron en las siguientes condiciones: i) círculo abierto c/agt. ii) círculo cerrado s/agt. i) círculo cerrado c/agt.



La figura 2.3.4.1 muestra las respuestas tensamétricas en cada uno de los experimentos anteriores. En todos las condiciones de medida se

observa que la corriente del oxígeno aumenta y el E_p se hace más catódico conforme I_1 aumenta. La magnitud de estos cambios depende de la manera en que se llevó a cabo la preconcentración:

- Por los cambios en la corriente en las curvas de la figura 2.4.3.1.i, se concluye que la enzima se adsorbe de manera natural.

- En la figura 2.4.3.1.ii, se aprecia la aparición de un pico de adsorción (pre-pico) a 0mV; la intensidad depende de I_1 . Por el valor de i_p de adsorción se deduce que la enzima se concentra conforme I_1 se incrementa; esto modifica el valor de la corriente de reducción de oxígeno.

- De la figura 2.4.3.1.iii, se observa también el pico del proceso de desorción. Como los valores de i_p de oxígeno se mantienen casi constantes, se cree existe una saturación de la enzima en la interfase.

Para una mejor visión del pre-pico, en la figura 2.3.4.2 se muestra la zona de potencial donde aparece el fenómeno superficial para la figura 2.3.4.1.ii y 2.3.4.1.iii. En todas las curvas se presenta pico agudo, característico de los curvas tensamétricas donde se presenta un fenómeno de desorción. Este pico de desorción se le atribuye a la enzima. El pico de las curvas de la figura 2.3.3.1 (sección 2.3.3), es poco agudo y no puede asignar a un proceso de desorción, sino a un proceso difusional.

De la figura 2.2.2.1.b se encuentra que el valor potencial de pico para oxígeno es el mismo que para el pico obtenido en la figura 2.3.3.1; por lo tanto ambas señales proceden de la reducción de oxígeno. Si existe un proceso de desorción, éste no es visualizado ya que el límite de oxidación no lo permite.

De las observaciones en esta sección y de la información de CC se deduce que la desorción de la enzima se produce a potencial de 0mV y que el oxígeno, que no fué eliminado completamente, produce la señal de la figura 2.3.3.1.

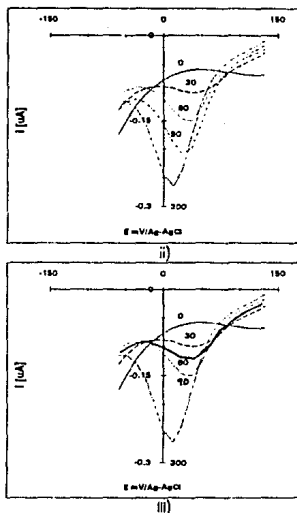


Fig 2.3.4.2 Tensametría de medio fosfato con O_2 a saturación y enzima; para las condiciones de medida i) y ii) y I_1 de 0, 30, 60, 90 y 300 μ A (que se encuentran marcados en las curvas). $[Enz]=5.4$ nM.

Se observó que la cantidad de enzima concentrada es importante para la reproducibilidad de los resultados. Por ello se propone que los estudios de voltamperometría lineal se lleven a cabo en condiciones apropiadas de potencial y el llamado tiempo de reposo sea mínimo, y si es posible no imponer potencial hasta que el barrido de potencial se inicie.

2.4 Polarografía clásica.

2.4.1 Marco teórico.

Después de haber efectuado los experimentos de cronocoulometría y de tensometría; se procedió a diseñar los mejores condiciones de operación en polarografía clásica, para evitar en la medida de lo posible la adsorción. La ventana de tiempo en polarografía clásica es grande ya que está determinada por el tiempo de goteo (1-3s). Debido a que un polarograma comprende la existencia de varias gotas (electrodos nuevos); no existe tiempo de preconcentración mayor al tiempo de goteo, y como su tiempo ventana es distinto; los resultados obtenidos son también diferentes.

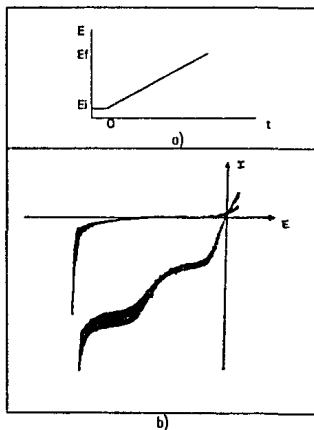


Fig 2.4.1.1 Programa de potencial aplicado en experimentos de polarografía. 2) Respuesta característica para la disolución de electrodo soporte en presencia de oxígeno a saturación con sistema de electrodos de Pt, EGM, EA: platino y ER: ECS. Se observa que la reducción de oxígeno se lleva en dos etapas.

El programa de potencial aplicado es un barrido lineal, que se presenta en la gráfica 2.4.1.1.a. La figura 2.4.1.1.b es la respuesta característica para la reducción de oxígeno a saturación en ES.

La expresión que rige un proceso electroquímico en condiciones de gradiente máximo (corriente límite de dilución); para polarografía clásica, fué propuesta por Ilkovic:

$$i_d = 607nm^{2/3}t^{1/6}D^{1/2}C_0^* \quad (2.4.1.a)$$

m es el flujo de mercurio; t es tiempo de goteo; los demás símbolos tiene el significado habitual. La ecuación anterior se corrigió posteriormente por efectos de difusión esférica. Koutecky encontró la siguiente relación (2.4.1.2):

$$i_d = 607nm^{2/3}t^{1/6}D^{1/2}C_0^* \left[1 + 39 \left(\frac{D^{1/2}t^{1/6}}{m^{1/3}} \right) \right] \quad (2.4.1.2)$$

2.4.2. Condiciones de medida.

El estudio polarográfico consistió en la obtención de curvas intensidad-potencial de las siguientes disoluciones de ES:

- libra de oxígeno.
- en presencia de oxígeno a saturación (Anexo A).
- con oxígeno a saturación y diferentes concentraciones de catalasa ([Enz]=0, 2, 4, 6, 14, 18 y 22nM aproximadamente).
- La concentración de oxígeno 0.206mM se determinó mediante electrodo selectivo de oxígeno (Clark) en condiciones convectivas.

2.4.3. Comportamiento de ES+O₂.

En la figura 2.4.1.1.b se presenta el dominio de electroactividad (DE) y un polarograma típico de la disolución de buffer de fosfatos (ES) con oxígeno a saturación.

De los resultados obtenidos se observó:

El-DE no presentó reacciones electroquímicas que pudieran interferir.

Las dos ondas de reducción de oxígeno, presentan E_{1/2} de -100 y -1100, los cuales corresponden al paso de O₂/H₂O₂ y de H₂O₂/H₂O.⁵⁷ Los valores de corriente límite de difusión (i_d) en ambas es similar y aproximadamente de 2μA.

De la primera etapa de reducción de oxígeno, experimental, se calculó el valor de coeficiente de difusión para oxígeno; 8.88•10⁻⁶cm²/s (ec. 2.4.1.1); mientras que el valor del coeficiente de difusión, realizando la iteración de la ecuación de Ilkovic corregida (ec. 2.4.1.2), fue de 7.13•10⁻⁶cm²/s. La iteración se llevó a cabo en una calculadora HP modelo FX100 que contiene un programa especial diseñado por esta casa comercial. El coeficiente de difusión para O₂ en una disolución acuosa que contiene NaOH 0.1M, determinado por VL y que se reporta en la literatura es de: 2.28•10⁻⁵cm²/s. Como se observa hay una diferencia considerable entre los valores obtenidos experimentalmente con el reportado de la literatura, debida probablemente a la diferencia viscosidad entre la disolución de NaOH y de buffer de fosfatos.

2.4.4 Comportamiento de ES+O₂+Enz.

La tabla 2.4.4.1 presenta los valores de corriente límite de difusión del oxígeno; en función de la concentración de catalasa en solución.

Del comportamiento polarográfico en ES+O₂+Enz se pueden destacar los siguientes puntos:

- En la primera reducción la (i_d) se incrementa con [Enz], los incrementos no son directamente proporcionales con [Enz].

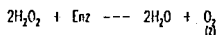
- Un efecto contrario produce en la segunda reducción la catalasa, este efecto se muestra en la segunda columna de la tabla 2.4.4.1.

- Si se realiza la suma de las corrientes, se nota una pequeña disminución desde la primera adición y casi permanece constante (tabla 2.4.4.1, tercera columna).

| [E] | iO ₂ | iH ₂ O ₂ | Suma |
|-----|-----------------|--------------------------------|------|
| mM. | μA | μA | μA |
| 0 | 6.8 | 6.7 | 13.5 |
| 2 | 7.2 | 3.8 | 11 |
| 6 | 7.7 | 2.8 | 10.5 |
| 14 | 8.3 | 2.7 | 11 |
| 18 | 8.4 | 2.5 | 10.9 |
| 22 | 8.7 | 1.9 | 10.6 |

Tabla 2.4.4.1 Valores de corriente límite de difusión para las reducciones de oxígeno en presencia de catalasa a diferentes concentraciones. La suma de ambas corrientes se representa en la cuarta columna. La concentración de oxígeno en todos los experimentos es constante e igual a 0.205 mM.

El proceso de dismutación es el siguiente:



La reacción (1) es electroquímica; y la (2), química. Es interesante mencionar que el oxígeno se reduce en el electrodo, a peróxido; y se regenera por la reacción química (2) a una gran velocidad. Este oxígeno se reduce simultáneamente con el oxígeno que difunde desde la capa de Nernst, provocando un "exceso" de oxígeno en la interfase. En la segunda reducción, a potenciales más negativos, el peróxido en la interfase disminuye ya que la enzima reacciona con él, provocando un "defecto" de peróxido. En el anexo B.5 se encuentran las ecuaciones que muestran lo mencionado anteriormente.

Para un fenómeno catalítico de dismutación, los cambios de i_{O_2} y de i_{HO_2} con $[Enz]$ son característicos. Para el cambio global su comportamiento no es tan evidente.

De los resultados por CC y tensametría, la posible explicación a este fenómeno es la siguiente:

- adsorción del oxígeno en la interfase sección 2.2.4 (Tabla 2.2.4.1).
- adsorción de enzima sección 2.2.5 (figura 2.2.5.1)
- efecto catalítico de dismutación en la reducción de oxígeno (figura 2.2.6.1.a), por acción de la catalasa. Adsorción en la interfase Hg/disolución de $ES+O_2+Enz$. (figura 2.2.6.1.b). Sección 2.2.6.
- de la sección 2.3.4, figura 2.3.4.1, fenómeno de adsorción-desorción de enzima y modificación de la corriente de pico del oxígeno.

A partir de todo lo citado anteriormente, se puede concluir que existe una competencia entre las adsorciones de los especies O_2 , HPO_4^{2-} y enzima; esto competencia se pone de manifiesto en los resultados obtenidos. La reducción de oxígeno requiere una adsorción previa de éste en la interfase. Al agregar enzima, la cantidad de oxígeno adsorbido disminuye de manera importante, ya que es desplazado parcialmente por moléculas de enzima. Como la cantidad de oxígeno adsorbido decrece, los valores de corriente total son menores, a pesar de que existe la reacción química acoplada.

De lo anterior se puede establecer que no es fácil determinar una constante de velocidad de dismutación para la catalasa. A pesar de ello el autor cree en la posibilidad de calcular un valor de constante de velocidad "condicional" para la enzima.

2.4.5 Cálculo de la constante de dismutación "condicional".

Para encontrar la constante de velocidad de dismutación condicional; se aplicaron algunas

relaciones propuestas en diferentes publicaciones previas; y que se tomaron como base, por tener condiciones similares, en este trabajo.

2.4.5.1 Método de Koutecky (1)

Koutecky⁵³ establece una ecuación que involucra la relación de corriente límite de difusión en presencia y ausencia de catálisis i_k e i_d respectivamente; toma en cuenta el transporte de masa por convección y el crecimiento de la gota de mercurio. La función completa depende de varios parámetros y presenta un comportamiento asintótico, sin embargo, si la relación se encuentra entre el intervalo $1 < (i_k/i_d) < 4$, la función es directamente proporcional a la concentración de enzima:

$$F = \left(\frac{i_k}{i_d} \right) = k[Enz]t \quad (2.4.5.1)$$

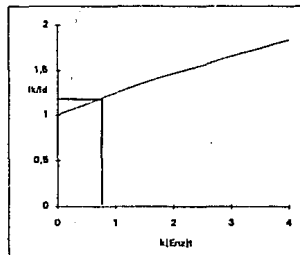


Fig. 2.4.5.1.2 Función propuesta por Koutecky para la evolución de constante catalítica. $F = (i_k/i_d) = k[Enz]t$.

donde k es la constante de dismutación; t , tiempo de goteo y $[Enz]$, concentración de enzima. Las limitaciones de este modelo son: considera la regeneración total del reactivo e ignora los efectos de adsorción (En el Anexo 8.5 se dan los

diferencias entre un fenómeno coloidal y de dismutación, en sus condiciones iniciales y de frontera).

En la gráfica 2.4.5.1 se presenta la curva de trabajo de la función de Koutecky en la región de $(k[Enz]t) = 0-4$. Para cada valor de (i_p/i_d) , se localiza el punto en la curva y se determina el valor de la abscisa $(k[Enz]t)$. Como se conoce el valor de la concentración de enzima y tiempo de goteo, se determina el valor de la constante.

La tabla 2.4.5.1.1 presenta los valores de (i_p/i_d) y de constante de dismutación (k) en función de $[Enz]$. Se observa que la constante varía con la concentración. Se observa la disminución de k conforme $[Enz]$ se incrementa. Esta desviación del valor de la constante, puede deberse a:

- el modelo propuesto considera la recuperación total del reactivo
- no toma en cuenta los fenómenos de adsorción.
- otro factor importante, que bien pudo afectar a la constante; es el de considerar que la cinética de reacción es de primer o pseudo-primer orden y el proceso tenga un orden diferente.

| $[Enz]$ mol | i_p/i_d | $k([Enz]t)$ mol/mol |
|----------------|-----------|------------------------|
| 2 | 1.06 | 11.30 |
| 6 | 1.13 | 8.75 |
| 14 | 1.22 | 6.52 |
| 18 | 1.24 | 5.25 |
| 22 | 1.28 | 5.11 |

Tabla 2.4.5.1.1 Valores de constante calculadas para diferentes concentraciones de enzima, calculadas a partir de la función de trabajo de la figura 2.4.5.1.1. Las unidades de la constante son: mol de peróxido transformados en un segundo por mol de enzima.

2.4.5.2 Método de Koutecky-Brdicka (2).

El mismo Koutecky²⁸ propone otra relación útil para la evaluación de la constante. Para llegar a este modelo resuelve las ecuaciones diferenciales apropiadas, tomando en cuenta el crecimiento de la gota de mercurio; y que el producto de despolarización (H_2O_2) regenera, por reacción con la enzima, la mitad de cantidad inicial de oxígeno. La ecuación que el propone es válida, sólo si el espesor de la capa de reacción es menor que la capa de difusión.²⁹ La capa de reacción corresponde aproximadamente a la distancia a través de la cual, las moléculas de peróxido de hidrógeno se mueven dentro de su tiempo de vida media, antes de reaccionar con la enzima—i.e. $\tau = (1/k[Enz])$. La expresión (2.4.5.2.1) relaciona exclusivamente variables medibles; bajo la premisa de una capa de reacción pequeña, producto de una constante de dismutación elevada:

$$F = \frac{7.42 \left(\frac{i_p}{i_d} - 1 \right)}{2.25 - \left(\frac{i_p}{i_d} \right)} = k[Enz]t \quad (2.4.5.2.1)$$

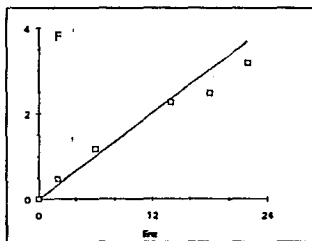


Fig 2.4.5.2.1 Representación gráfica de la función de Koutecky: $[7.42(i_p/i_d - 1)]/[2.25 - (i_p/i_d)]$ vs $[Enz]$

²⁸ La hipótesis de Nernst supone la existencia de una capa cercana a la interfase electroquímica; hasta donde llegan las especies electroactivas por convección y el transporte a través de ella se realiza exclusivamente por difusión.

la reacción química acoplada. La expresión final de Kern y Orleman es la siguiente:

$$\left(\frac{i_a}{i_d}\right) = 1 + \beta^2 \cdot (i_a) \quad (2.4.5.31)$$

donde:

$$\beta^2 = \left(\frac{0.2kz}{607nm^{2/3}i_d^{1/2}D^{1/2}} \right) \quad (2.4.5.32)$$

que es apropiada para procesos donde la actividad catalítica es grande pero la relación de corrientes es cercana a la unidad. A esta ecuación se le hará una pequeña modificación para calcular el valor de la pendiente:

$$\left(\frac{i_a}{i_d} - 1\right) = \beta^2 \cdot (i_a) \quad (2.4.5.33)$$

La figura 2.4.5.3.1 muestra la gráfica de $[(i_a/i_d) - 1]$ vs (i_a) , que es una línea recta, con ordenada al origen igual a (-1) . En la gráfica se observa que si $i_a = i_d$, la ordenada es de cero y la constante vale cero. A partir del valor de la pendiente se calcula la magnitud de la constante de la reacción acoplada. Todos los puntos que se representan están sobre la recta, que trae por consecuencia que el valor de la constante sea el mismo en todos los valores de $[Enz]$. El valor de la constante para este modelo es de $14.70 \cdot 10^7$ mol de peróxido transformados en un segundo por mol de catalasa.

En la figura 2.4.5.2.1 se muestra la representación de la función F vs $[Enz]$. La función sigue una línea recta en las condiciones de medida, con ordenada al origen de cero. Se observa que a concentraciones mayores de $14nM$ de enzima, existe una desviación del comportamiento lineal. Como el modelo considera la reacción de dismutación y geometría del electrodo la desviación probablemente se debe a los fenómenos de adsorción. El valor de pendiente permite evaluar la constante de dismutación que presenta un valor de $14.77 \cdot 10^7$. En la tercera columna de la tabla 2.4.5.2.1 se presentan los valores de la constante calculada punto por punto. Se observa que existen diferencias entre cada una de las constantes y, a su vez, con la calculada a partir de la pendiente.

| $[Enz]$ nM. | i_a | k [$l \cdot s^{-1}$] |
|----------------|-------|--------------------------|
| 2 | 1.06 | 20.71 |
| 6 | 1.13 | 14.87 |
| 14 | 1.27 | 13.29 |
| 18 | 1.24 | 12.92 |
| 22 | 1.28 | 12.74 |
| | | 14.77 |

Tabla 2.4.5.2.1 Valores de constante de dismutación para la catalasa a diferentes $[Enz]$ calculados a partir de la ecuación 2.4.5.2.1. en la parte inferior se muestra el valor de constante obtenido por el valor de la pendiente.

2.4.5.3. Método de Kern & Orleman.

Kern y Orleman⁴⁹ obtuvieron una relación entre el incremento de i_a y la constante de dismutación; la cual es muy simple para velocidades de catálisis y concentraciones de origen bajas. El modelo se basa en la formación de un volumen de reacción -formado por la capa de reacción multiplicada por la superficie electrodo- y supone la existencia de una corriente de difusión natural y otra proveniente de

| $[Enz]$ nM. | i_a μA | i_a/i_d adimens. |
|----------------|------------------|-----------------------|
| 0 | 6.8 | 1.0 |
| 2 | 7.2 | 1.06 |
| 6 | 7.7 | 1.13 |
| 14 | 8.3 | 1.22 |
| 18 | 8.4 | 1.24 |
| 22 | 8.7 | 1.28 |

Tabla 2.4.5.3.1 Valores de i_a (i_a/i_d) y k (constante de dismutación) a diferentes concentraciones de catalasa.

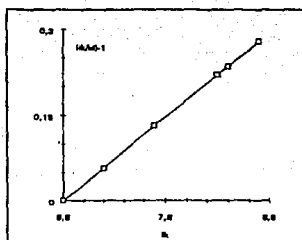


Fig. 2.4.5.11 Representación de la función de Ordenamiento de Kern, para obtener la constante de dismutación.

Como se observa, todos los modelos empleados para la evaluación de la constante, proporcionan el mismo orden de magnitud para la dismutación del peróxido catalizado por la acción de la catalasa. Sin embargo el valor de la constante es mayor conforme la concentración de enzima disminuye. Esta desviación puede deberse a la adsorción. Aunque se minimiza, no se elimina completamente la adsorción en esta técnica.

Por las consideraciones indicadas en cada modelo, podría proponerse que las velocidades obtenidas para k , por el método de Koutecky (2) podrían ser los más cercanos a los valores reales.

2.5 Voltamperometría de barrido lineal de potencial.

2.5.1. Marco teórico.

Una vez comprobada la adsorción y su posible alteración a los valores de corriente, es fundamental que se seleccione el valor de potencial de inicio de barrido y evitar un periodo de tiempo "quieto" entre cada voltamperograma, esto evita la preconcentración. Se llama tiempo "quieto" al tiempo que transcurre cuando se cierra el circuito y el inicio de barrido de potencial. Todos los voltamperogramas se realizaron en las condiciones generales de: tiempo "quieto" nulo; $E_i = 150 \text{ mV/Ag-AgCl}$; la velocidad de barrido de potencial está comprendida en el intervalo de 5-250 mV/s (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200 y 250).

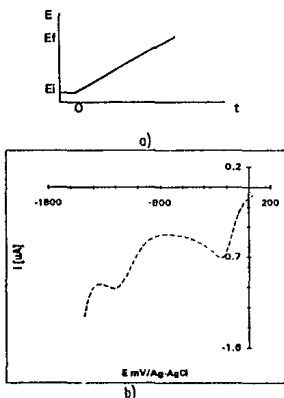


Fig 2.5.1.1 a) Programa de potencial aplicado a los experimentos de VL; b) Respuesta típica de la reducción de oxígeno en ES 0.1M, pH=7.0, 5°C v=250mV/s.

La gráfica 2.5.1.1.a muestra el programa de potencial utilizado en los experimentos de voltamperometría lineal; y la figura 2.5.1.1.b la respuesta típica obtenida con el programa de potencial anterior. En esta figura se muestra la forma en que se determinan gráficamente los parámetros más importantes de la curva: potencial de pico (E_p), potencia de medio pico ($E_{p/2}$) corriente de pico (i_p) y corriente de medio pico ($i_{p/2}$).

La ecuación que rige el proceso electroquímico para sistemas rápidos, fué propuesta por los autores Randles & Sevcik para un sistema rápido:

$$i_p = 2.99 \cdot 10^5 n^{3/2} AD^{1/2} v^{1/2} C_0^* \quad (2.5.11)$$

el primer término es una constante de proporcionalidad, y v es la velocidad de barrido de potencial. Los demás términos tienen el significado habitual. Para procesos lentos se incluye el parámetro αn_α para el paso determinante de la cinética:

$$i_p = 2.99 \cdot 10^5 n(\alpha n_\alpha)^{1/2} AD^{1/2} v^{1/2} C_0^* \quad (2.5.12)$$

Esta última ecuación es la que se utilizará en esta parte del trabajo, ya que por polarografía se encontró que la reducción del oxígeno es lenta.

2.5.2. Condiciones de medida.

El estudio voltamperométrico se efectuó imponiendo las condiciones anteriores a las disoluciones:

- ES libre de oxígeno.
- ES con oxígeno a saturación.
- ES saturada de oxígeno a diferentes concentraciones de enzima. (a cada concentración se impusieron todas las velocidades de barrido).
 - Se renovó la superficie de EGSM en cada experimento.

2.5.3. Comportamiento de ES+O₂.

De la serie de experimentos realizados se pueden realizar las siguientes observaciones:

El dominio de electroactividad se encuentra entre 200 y -1200mV; no presenta reacciones electroquímicas detectables en la escala de 0-2 μ A, en ninguna de las velocidades de barrido de potencial.

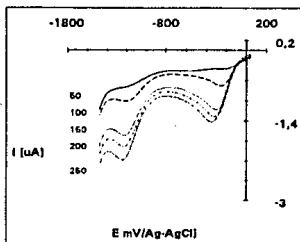


Figura 2.5.3.1 Reducción de oxígeno en ES a diferentes velocidades de barrido: 50, 100, 150, 200 y 250mV/s, las cuales se encuentran marcadas en la figura.

En la figura 2.5.3.1 se presentan las dos etapas de reducción del oxígeno en ES a saturación y diferentes velocidades de barrido de potencial. El oxígeno presenta dos picos de reducción: O₂ a H₂O₂ y de éste a H₂O; a valores de -0.200 y -1.600V/Ag-AgCl.

La gráfica 2.5.3.2 muestra los valores de i_p en función de $v^{1/2}$ para la primera y la segunda reducción de oxígeno.

En ambos procesos i_p aumenta con $v^{1/2}$. Para la primera reducción, el comportamiento lineal se encuentra entre 0 a 0.445 (V/s)^{1/2}; el proceso es difusional ya que cumple con la relación de Randles & Sevcik. La ordenada al origen es diferente de cero, que puede ser consecuencia de la adsorción evidenciada en CC y lensametría. Se observa que la

segunda reducción el proceso está también limitado por la difusión, entre los valores de 0-0.178 (v/s)^{1/2}.

Sólo la primera reducción se estudiará la primera reducción de O₂ en VL, por las razones discutidas previamente en CC.

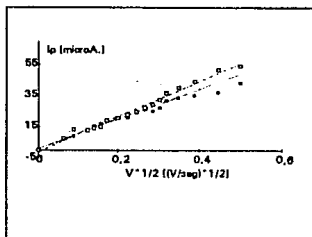
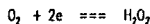


Fig 2.5.3.2 i_p en función de $v^{1/2}$ para las reducciones de oxígeno en ES: primera reducción, segunda reducción.

Para encontrar el valor de αn_{α} de la primera reducción del oxígeno, se realizó la representación de $(E_p/2)_2 - (E_p/2)_1$ vs $\ln(v_1/v_2)^{1/2}$ a diferentes velocidades de barrido. $(E_p/2)_1$ es el valor de pico medio obtenido a la velocidad de barrido v_1 ; y $(E_p/2)_2$, para v_2 . A partir de la pendiente: $(RT/\alpha n_{\alpha} F)$ -recomendado por Nicholson & Shainse dedujo el valor de αn_{α} .

Para encontrar el valor de M se realizó la gráfica de i_p vs $\exp[-\alpha n_{\alpha} F/RT](E_p - E')$ a diferentes valores de v . A partir del valor de la pendiente: $0.227nFAC\alpha M$, se determinó M . El potencial condicional E' se dedujo a partir de su potencial normal y de las condiciones de trabajo: pH, fuerza iónica, temperatura, ES, concentración de oxígeno. . .

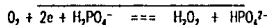
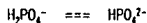
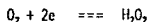


La ecuación de Nernst para este equilibrio es la siguiente:

$$E = E^{\circ} + (RT/nF) \log \left\{ [O_2][H^+]^2 / [H_2O_2] \right\}$$

$$E^{\circ} = 0.69V/ENH.$$

Como el ES es una solución de $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1M, pH=7.0 y el intercambio electrónico implica la donación de protones de la especie ácida, del par conjugado; el equilibrio global es:



La constante de acidez para: $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tiene un valor de 6.9^{M} (fuerza iónica de 0.1). Haciendo las sustituciones pertinentes el valor del potencial condicional a temperatura ambiente es de $E^{\circ} = 0.270V/ENH$.

Los parámetros cinéticos calculados experimentalmente son: $\alpha_{\text{cat}} = 0.65$, del paso limitante; $k^{\circ} = 3.3 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, constante de velocidad estándar heterogénea. Los valores de los mismos en la literatura¹ (para NaOH 0.1M. y trifenilfosfina TPPPO 0.05%) son de: $\alpha_{\text{cat}} = 0.53$ y $k^{\circ} = 3.3 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$. Nótese la gran diferencia entre la constante k° ya que la interfase electrodo se modifica drásticamente por la presencia de TPPPO, ya que cambia la esfera de solvatación del O_2 en la interfase, debido a la intensa adsorción de TPPPO.¹

2.5.4. Comportamiento de $ES+O_2+Enz$.

Las condiciones impuestas para la realización de los experimentos de voltamperometría son las que permiten controlar la adsorción de enzima a un nivel mínimo posible, determinadas por CC y lensametría. En la tabla 2.5.4.1 se presentan los valores de i_p para cada velocidad y algunas concentraciones de enzima.

corriente de pico

| [E] nM | corriente de pico µA | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 | 150 | 200 | 250 | |
| 0.0 | 3.1 | 4.0 | 5.7 | 7.3 | 8.0 | 8.7 | 10.0 | 11.0 | 13.0 | 15.0 | 15.0 | |
| 0.3 | 3.9 | 4.4 | 6.0 | 7.7 | 8.3 | 9.1 | 10.0 | 11.0 | 14.0 | 15.5 | 17.0 | |
| 0.6 | 4.6 | 5.1 | 6.6 | 8.3 | 9.0 | 9.9 | 11.0 | 12.0 | 15.0 | 17.0 | 19.0 | |
| 0.9 | 4.9 | 5.5 | 7.2 | 8.8 | 9.4 | 10.0 | 12.0 | 13.0 | 17.0 | 17.0 | 19.0 | |
| 1.2 | 5.1 | 5.7 | 7.4 | 9.1 | 9.8 | 10.0 | 12.0 | 13.0 | 15.0 | 17.0 | 19.0 | |
| 1.5 | 5.3 | 5.9 | 7.5 | 9.3 | 9.9 | 11.0 | 12.0 | 13.0 | 16.0 | 18.0 | 20.0 | |
| [I] nM | v_{cat} | | | | | | | | | | | |
| 0.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| 0.3 | 1.26 | 1.10 | 1.05 | 1.05 | 1.04 | 1.04 | 1.0 | 1.0 | 1.06 | 1.03 | 1.13 | |
| 0.6 | 1.43 | 1.28 | 1.15 | 1.14 | 1.13 | 1.14 | 1.10 | 1.0 | 1.15 | 1.13 | 1.26 | |
| 0.9 | 1.58 | 1.38 | 1.26 | 1.20 | 1.18 | 1.15 | 1.20 | 1.09 | 1.30 | 1.13 | 1.26 | |
| 1.2 | 1.65 | 1.43 | 1.30 | 1.25 | 1.20 | 1.15 | 1.20 | 1.18 | 1.15 | 1.13 | 1.26 | |
| 1.5 | 1.70 | 1.48 | 1.32 | 1.27 | 1.24 | 1.26 | 1.20 | 1.18 | 1.23 | 1.20 | 1.33 | |

Tabla 2.5.4.1 Corrientes de pico de reducción de oxígeno (i_p) y relación de corriente catódica/difusional a diferentes velocidades de barrido de potencial y de concentración de catalasa. Origen a saturación.

A partir del comportamiento de la primera reducción de oxígeno con catalasa se pueden destacar varios aspectos:

- se observa que a $v = \text{cte}$, la corriente de pico se incrementa con la $[Enz]$ Para $v < 60 \text{mV/s}$, el incremento es continuo para cualquier $[Enz]$. Cuando $v \geq 60 \text{mV/s}$, el incremento sólo es visible a $[Enz]$ menores.
- para $[Enz] = \text{cte}$, la relación entre $i_{\text{cat}}/i_{\text{d}}$ disminuye conforme v aumenta.
- si la velocidad de barrido de potencial es de 5mv/s , la corriente de pico aumenta proporcionalmente con la concentración de enzima hasta un valor de 1.5nM , posteriormente se mantiene casi constante.
- lo anterior no sucede con barridos más rápidos. La magnitud de los cambios es un poco irregular y depende de la velocidad de barrido de potencial.
- no se detecta el pico del fenómeno adsorción/desorción asociado a la enzima.

Para concentraciones fijas de enzima se hicieron las representaciones de i_p vs $v^{1/2}$, todas presentan comportamiento lineal. Los valores de pendiente, ordenados y coeficiente de correlación de cada una de las rectas, se presentan en la tabla 2.5.4.2.

| [Enz] | Pend | Ord | R |
|-------|-------------------------|---------|--------|
| mM | $\mu A/(v^{1/2})^{1/2}$ | μA | admen. |
| 0.0 | 1.11 | 17.3 | 0.987 |
| 0.3 | 1.54 | 20.4 | 0.991 |
| 0.6 | 1.48 | 23.7 | 0.984 |
| 0.9 | 1.78 | 24.2 | 0.979 |
| 1.2 | 1.95 | 24.7 | 0.978 |
| 1.5 | 2.04 | 22.6 | 0.989 |

Tabla 2.5.4.2 Valores de pendiente y ordenado de la representación de i_p vs $v^{1/2}$ en función de la concentración de catalasa.

Se observa un incremento en el valor de la pendiente de las curvas i_p vs $v^{1/2}$ conforme [Enz] aumenta. Esto es lógico ya que indica un aumento en la cantidad de oxígeno en la interfase electroquímica disponible para reducirse en cada velocidad de barrido. Esta pendiente es igual a (de la ecuación 2.5.1.2):

$$pend = 2.99 \cdot 10^5 n(\alpha n_a)^{1/2} AD^{1/2} C_D^0$$

de lo que se infiere que la concentración en la interfase se incrementa con [Enz]. Lo anterior se toma en cuenta en las condiciones de frontera que se dan en el anexo B.5.

2.5.5. Cálculo de la constante "condicional"

Se utiliza un modelo propuesto en la literatura para encontrar el valor de constante de dismutación, que el autor aplica para para el peróxido de hidrógeno catalizado por la enzima.

• Saveant & Vianello⁵⁵ proponen la evaluación de la constante de reacción a partir de la expresión:

$$(i_{\infty})_{D_0} = \left(\frac{1}{0.447} \right) \cdot \left(\sqrt{\frac{RT}{nF} \frac{2k_1 [Enz]}{v}} \right) \quad (2.5.5.1)$$

donde $(i_{\infty})_{D_0}$ es el valor límite de la corriente catalítica (no depende de v) y se encuentra en un potencial lo suficientemente alejado de E_p en presencia de catalasa (160–300mV hacia la región catódica); el subíndice D_0 significa dismutación. Las limitaciones de este modelo: considera un sistema electroquímico rápido y que la reacción química acoplada es reversible.

El valor de la constante k_1 se divide entre la concentración de catalasa para obtener la constante de velocidad: $k = k_1/[Enz]$. El valor de k nos indica la rapidez en que una mol de enzima descompone a una mol de peróxido de hidrógeno. La figura 2.5.5.1 muestra el valor de k calculado para $v = cte$ a diferentes concentraciones de enzima. La figura muestra, la zona donde existe menor variabilidad, para diferentes v , las curvas de k vs [Enz].

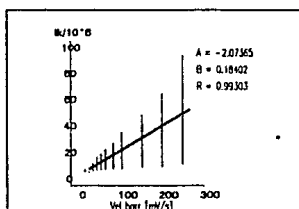


Fig 2.5.5.1 Valores de Constante de dismutación vs [Enz], a diferentes velocidades de barrido de potencial $v=3, 10, 20, \dots$, etc; que se marcan en la figura.

Se observa que el valor no es precisamente constante (a pesar del control de las condiciones

de medida) teniendo una gran variación sobre todo a concentraciones pequeñas de enzima y altas velocidades. Esto se debe a:

- los cambios entre un voltamperograma y otro son menos notorios; por lo tanto más inexactos.
- la ventana de tiempo es inadecuada para la evaluación.
- podría deberse principalmente a los fenómenos de adsorción;
- despreciar las contribuciones de corriente capacitiva y caída óhmica, lo que provoca mediciones inadecuadas de i_p
- y encontramos en un tiempo de perturbación poco indicado para observar los cambios.

Finalmente se presenta en la tabla 2.5.5.1 el intervalo de valores de constante de dismutación para las técnicas de polarografía y de voltamperometría.

| Constante de dismutación ($E+7$) | |
|------------------------------------|---------------|
| $k_{mix} > k > k_{min}$ | |
| Polarografía | |
| Ec. 2.4.5.1.1 | 11.30 - 5.11 |
| Ec. 2.4.5.2.1 | 20.71 - 14.77 |
| Ec. 2.4.5.3.1 | 14.7 |
| Voltamperometría lineal** | |
| Ec. 2.5.5.1 | 9.00 - 0.50 |

Tabla 2.5.4.1 valores de constante de dismutación para polarografía y voltamperometría lineal ** (omisión de la región más constante (figura 2.5.5.2) a concentraciones mayores de 1.5 nM de enzima catalasa.

En esta tabla se observa que los valores de constante de dismutación "condicional", obtenidos en polarografía y voltamperometría lineal; tienen valores entre 0.5 y 20.71×10^7 ; que es intervalo muy

grande, sin embargo el valor de la literatura (1.3×10^7 , 1.7×10^7 y 3.0×10^7),^{18,20,21} se encuentra en el intervalo de constante obtenida para VL. El intervalo para cualquiera de los métodos en polarografía es mayor por un orden.

Se podría decir que todos los modelos proporcionan valores de constante un poco elevados. Como ya se mencionó este valor depende de la técnica, concentración de enzima y tiempo ventana. La posible explicación a este hecho es:

- en el método propuesto por Koutecky (1) no considera la adsorción, ni la semi-regeneración del oxígeno.
- tanto en el segundo modelo de Koutecky como en el de Kern, toma en consideración la semi-regeneración pero no los fenómenos de adsorción.
- en polarografía se considera que el "envenamiento" de la superficie del electrodo se controla por la caída de la gata, pero no se elimina. Se propone que la adsorción de la enzima en la interfase evita que el O_2 se adsorba con la misma intensidad, pero se podría concluir que el fenómeno catalítico es mayor ya que se observa un incremento en i_p .
- para VL, los posibles fuentes de error más importantes son: la no corrección de la corriente capacitiva y la caída óhmica, ignorar la adsorción y la lentitud del sistema.

Como podrá observarse las posibles causas de desviación de la constante son muchas, sin embargo, la constante no es tan desproporcionada con respecto a la reportada en la literatura. El autor cree que los resultados obtenidos son excelentes dada la complejidad del proceso estudiado.

CAPITULO III:

ESTUDIO ELECTROQUIMICO

DE LA ENZIMA

SUPEROXIDO-DISMUTASA

3.0 ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE LA ENZIMA SUPEROXIDO-DISMUTASA.

3.1 Antecedentes.

El oxígeno presenta varios intermediarios en su reducción hasta agua; uno de ellos es el superóxido (O_2^-). Las formas de producirse son especiales, ya que es muy inestable, entre ellas podemos citar:

- incidencia de radiación gamma o UV o una disolución alcohólica²⁶, que contenga oxígeno en el vacío,
- reducción de O_2 por xantina en presencia de xantina-oxidasa en el interior de las células.
- reacción electroquímica de O_2 en solventes apróticos (DMSO, DMF, MeCN, Py), en disolventes próticos no se forma el O_2^- ,
- disolución de superóxido de potasio (KO_2) en presencia de éteres corona³⁵ o criptatos³⁶,
- disolución directa de superóxido de tetraetilamonio (TEAS)³⁷ en disolvente apróticos.

Los primeros estudios^{25, 28} en los cuales se encontraron una serie de compuestos que poseían actividad catalítica para la dismutación del radical superóxido; lograron que se despertara un gran interés (por la importancia que tienen a nivel celular) en el estudio de metaloproteínas que contienen núcleos de Cu. Estas hemocupreínas presentan la propiedad de catalizar la dismutación del radical superóxido, por lo que reciben el nombre de superóxido dismutasas (SOD). La superóxido-dismutasa SOD (33,000g/mol) es una de las hemocupreínas más importantes. De entre las SOD se han encontrado macromoléculas que contienen núcleos metálicos; principalmente de Cu, y de algunos otros elementos: Zn (aislados de cloroplastos, sangre, hígado humano); Mg (algas,

mitocondrias y bacterias); Fe (bacterias y otros micro-organismos).

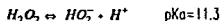
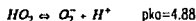
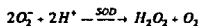
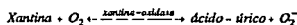
La reacción de dismutación espontánea depende del pH, como consecuencia de los equilibrios anteriores. En la tabla 3.1.1, se presentan los valores de constante en función del pH.

| pH | k [$l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$] |
|-------|---------------------------------------|
| 4.9 | 8.5×10^7 |
| >>4.9 | 1.0×10^2 |
| <<4.9 | 1.6×10^5 |

Tabla 3.1.1 Valores de constante de dismutación espontánea del radical superóxido en fase acuosa en diferentes zonas de pH.
Tomado de Bonnischsen, Chance & Ilcovek, *Acta Chem Scand. 1* (1970) 885.

Hay una contradicción entre estos valores y los reportados por McCord & Fridovich^{29,30}, ya que ellos reportan un valor de constante de 8.5×10^6 , entre pH 7 y 8.

El conjunto de reacciones que se llevan a cabo a nivel celular comprende:



En general los métodos para determinación de actividad de la enzima SOD se caracterizan por producir el sustrato in situ; usando diferentes

reactivos y enzimas. Los métodos se dividen esencialmente en directos e indirectos.

- Los indirectos involucran, frecuentemente, un reactivo de color y la espectrofotometría se utiliza como sistema de monitoreo y/o medida.
- Los métodos directos emplean instrumentos de medición que funcionan como sistemas de caracterización (pueden utilizarse también como sist. de monitoreo y/o medida) entre otros: electroquímico³⁸⁻⁴⁰, RMN^{19f41}, Stopped-flow⁴² y RPE^{43,44}.

En electroquímica se han realizado algunas investigaciones interesantes.

Rigo & Viglino²⁵ estudiaron la reducción de O_2 en medio borato pH=9.9 por polarografía clásica y determinaron el valor de la constante de dismutación, utilizando una relación de corrientes.

Más tarde Rigo & Rolfo⁴⁴ proponen la determinación simultánea de catalasa y SOD, con una disolución de material biológico en borato, utilizando el modelo de Koulecky mencionado en la sección 2.1.

Argese E. y colaboradores¹⁴, estudian la reducción de oxígeno en presencia de SOD, utilizando un electrodo giratorio de disco con una película de mercurio, en un intervalo de pH de 7.5-12; $[SOD]=10^{-7}-10^{-9}M$, $[TPPO]=5 \cdot 10^{-4}M$. En este trabajo se encuentra que la velocidad de dismutación es máxima entre pH=7.5-8.4

Yamaguchi S. y colaboradores⁴², determinaron la presencia de trazos de SOD, y su actividad por la técnica de Voltamperometría de pulso anódico en una disolución buffer de borato-carbonato pH=11, $TPPO=2.4 \cdot 10^{-4}M$, y $EDTA=2 \cdot 10^{-4}M$. La cantidad mínima detectable en condiciones muy especiales es de $10^{-12}M$.

Todos los estudios de dismutación, en presencia de enzimas, no están acompañados de un análisis de adsorción en la interfase eléctrica. Con el fin de poner en evidencia el fenómeno de adsorción (que afecta grandemente las mediciones); en este trabajo se realiza un estudio de Cronocoulombimetría de pulso inverso además de tensametría en varias disoluciones. En voltamperometría lineal se espera estimar el valor de la constante de dismutación y poner en evidencia la existencia de superóxido. De los resultados que se obtienen se concluirá acerca de la validez de los valores de constante determinados en la literatura.

3.2 Cronocoulombimetría de pulso inverso.

3.2.1. Marco teórico.

Con el fin de conocer si existen fenómenos de adsorción en la interfase electrodo-disolución de ES (0.1M, pH=7.8), oxígeno y la misma enzima se realizaron experiencias de cronocoulombimetría de pulso inverso. El sistema de electrodos usados en los experimentos de CC para SOD fueron los mismos que en la sección 2.2.1. Es importante hacer notar que a diferencia de esta sección el pH de solución es de 7.8, mientras que aquella es de 7.0. La simbología utilizada, así como las características de la técnica han sido descritas en el capítulo anterior (sección 2.2.1).

Para establecer el valor de potencial de inicio y el potencial final, así como el tiempo de pulso, se trazó el voltamperograma lineal de ES a $v=50\text{mV/s}$

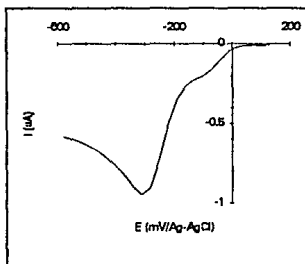


Fig. 3.2.1.1 Voltamperograma lineal de ES pH=7.8, 0.1M Oxígeno a saturación a 50 mV/s.

En la figura 3.2.1.1 se presenta la reducción de oxígeno a saturación (0.218mM) en la superficie del ECSM. Se observa el pico de la

primera reducción con $E_p=-0.300\text{V}$ - aproximadamente- con respecto al electrodo de referencia; bien definido y separado de la barrera anódica. Se observa que existencia de una señal de pre-pico aproximadamente a -150mV . La segunda onda de reducción del oxígeno está confundida con el límite de reducción. También, en esta parte, se estudia únicamente la región de la primera reducción por las mismas razones que se discutieron en la sección 2.2.1.

3.2.2. Condiciones de medida.

Con el objeto de caracterizar el comportamiento de ES, $\text{ES}+\text{O}_2$, y $\text{ES}+\text{O}_2+\text{Enz}$; se realizaron varios experimentos en CC:

- (1) -trazo de cronocoulogramas con $-\Delta E$ de 50, 100, 150, ... y 400mV; para cada valor de τ (10, 20, 30, 40, 80 y 150 ms). Representación gráfica, para cada uno de los cronocoulogramas, de Q_t vs $t^{1/2}$ y de Q_t vs Θ (figura 2.3.1.2 del capítulo anterior). Obtención de los valores de m_1 , m_2 , b_1 y b_2 por regresión lineal.
- (2) Con el fin de determinar si el oxígeno también se adsorbe en la interfase; se realizó la misma serie de experimentos de (1) para ES saturado con oxígeno.
- (3) Por último, para confirmar la actividad superficial, para diferentes concentraciones de enzima ([Enz]), se aplicó el mismo procedimiento que en (1). La concentración de enzima fué de: 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8 y 5.4nM.
- (4) Para conocer la respuesta del $\text{ES}+\text{O}_2+\text{Enz}$, se procedió de manera similar a (1); con cada una de las concentraciones de enzima citadas en (3), en presencia de oxígeno.

3.2.3. Comportamiento de ES.

En la figura 3.2.3.1. se muestra la respuesta típica de la reducción del ES, a diferentes magnitudes de pulso de potencial y $\tau=150\text{ms}$. La superficie del ECSM se renovó en cada medición y

su área fue prácticamente constante ($4.87E-3$ cm^2).

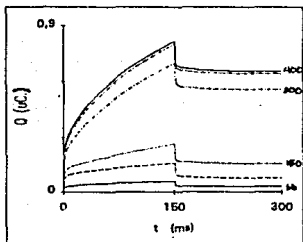


Fig. 3.2.1.1 Respuesta característica en los experimentos de CC de la reducción de oxígeno a saturación, en ES pH=7.8, 0.1M, V= 50 mV/s.

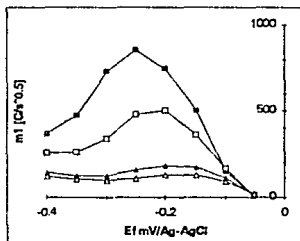
Al igual que en el capítulo anterior se linearizaron todos los cronocoulogramas para separar los componentes de carácter difusional y superficial. De los valores de ordenada para el pulso directo e inverso (b_1 y b_2) se calculó la carga gastada en la doble capa Q_{dl} . Es importante hacer notar que para que existan líneas rectas es necesario que exista una especie electroactiva para que siga la ecuación de Cottrell integrada. Así como en el capítulo anterior; se cree que el oxígeno tampoco fue eliminado completamente, y gracias a ella es posible evaluar tanto m y b de los pulsos directo e inverso para el ES.

En la figura 3.2.3.2.a y b se presentan los valores de pendiente directa e inversa para ES en función del pulso de potencial. En las curvas se muestra un pico muy acentuado, cuyo valor máximo se encuentra alrededor de -250 mV. Este es más evidente en el pulso directo y tiempos de pulso pequeños. Es probable que se deba a:

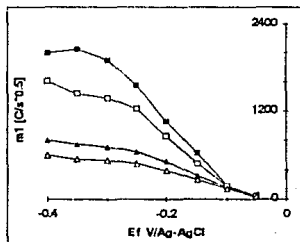
- la concentración de la especie O_2 aumenta un poco en pH=7.8 con respecto a pH=7.0 y es posible que quede O_2 en una

cantidad mayor (razón por la cual los pendientes de Q vs $t^{1/2}$ deben ser mayores)

- se observa en la figura 3.2.1.1 una señal pre-pico, asociada a la señal de reducción de oxígeno, atribuida a una fuerte adsorción, y que se observa también en CC.



a)

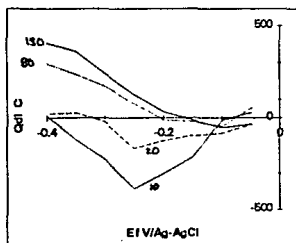


b)

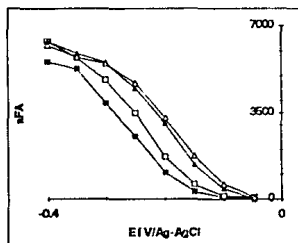
Fig. 3.2.3.2.a) Valores de pendiente de la recta Q vs $t^{1/2}$ a diferentes tiempos de adquisición. b) Valores de pendiente de la linearización del pulso inverso a valores de $\tau = 10, 20, 80$ y 150 ms.

Del valor de pendiente inversa no se observa la oxidación de la especie adsorbida, sin embargo numéricamente es mayor. Cosa que es contradictoria, ya que el proceso de oxidación es

muy lento. La explicación más coherente es que exista un cambio considerable de la corriente debido a los fenómenos adsorptivos.



a)



b)

Fig 3.2.3.1.a) Carga de la doble capa ES a diferentes τ : \bullet 10, \square 20, \blacktriangle 80 y \blacktriangle 150 ms respectivamente. b) Carga de especies adsorbidas en la interfase electrodlítica en cuatro tiempos diferentes de pulso.

Los valores de nFA_1 fueron calculados a partir de los valores de Q_{dl} y de los valores de ordenada al origen b_1 y b_2 . En la figura 3.2.3.1.b se representan los valores de "exceso superficial". Para los experimentos de ES (algunos autores le llaman experimentos de extrusión); la diferencia en

el valor de los excesos superficiales para el pulso directo e inverso, muestran la adsorción de la especie electroactiva adsorbida. A pesar de que los datos de Q_{dl} son muy diferentes, los de nFA_1 no lo son; esto implica que la reacción electroquímica de la especie adsorbida cambia de manera sustancial la estructura de la interfase. Se observa que la magnitud de la adsorción aumenta con la magnitud de ΔE . Según la forma de las curvas, se cree que existe una saturación de la interfase ya que no aumenta el valor de exceso superficial con ΔE .

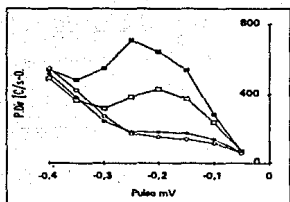
3.2.4. Comportamiento de ES+O₂

De la disolución ES con oxígeno a saturación se aprecia lo siguiente:

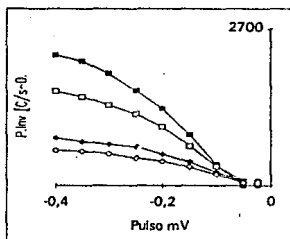
En la figura 3.2.4.1 se muestran las curvas de pendientes m_1 y m_2 vs ΔE a diferentes valores de τ . En la gráfica 3.2.4.1.a se observa que las curvas de m_1 presentan un comportamiento poco uniforme, ya que a τ pequeños presentan un máximo en aproximadamente -250mV (el valor de potencial y la respuesta en general es la misma que para la figura 3.2.3.1.a; que viene a corroborar que efectivamente existen trazas de oxígeno en ES). Se observa una "onda" incompleta de reducción ya que no se alcanza a detectar la meseta, debido a:

- el pH modificó el valor de potencial de reducción
- la causa más importante es el fenómeno de adsorción que modificó el valor de potencial de reducción (ΔE debió de abarcar hasta 600mV mínimo).

En el caso de m_2 , todas las curvas presentan la misma tendencia (3.2.4.1.b) sólo que la pendiente es un poco mayor comparada con la sección anterior, donde la concentración de oxígeno es menor. Aquí no se observa el "pico" intenso de adsorción.



a)



b)

Fig. 3.2.4.1. Pendientes de linealización para $ES+O_2$ a saturación, $\tau = \blacksquare 10, \square 20, \blacklozenge 80$ y $\blacklozenge 150$ ms
: a) m, pulso directo; b) m, pulso inverso.

En la figura 3.2.4.2 se presentan los valores de exceso superficial para $ES+O_2$ en función de ΔE o τ variable. Las curvas presentan una tendencia muy irregular y diferente a la figura 3.2.3.3.b:

- para $\Delta E < 200$ mV el término $nFAI\Gamma$, aumenta
- cuando $\Delta E > 200$ mV, disminuye.

El valor de cambio drástico de pendiente se encuentra entre -150 a -200 mV, precisamente en la zona de la aparición del pre-pico de adsorción. Para $ES+O_2$, por lo tanto no se presenta el

fenómeno de saturación observado en la sección anterior. Existe un valor de potencial donde el exceso superficial es nula y depende de τ . Se concluye que la presencia de oxígeno modifica de manera evidente las condiciones de la interfase.

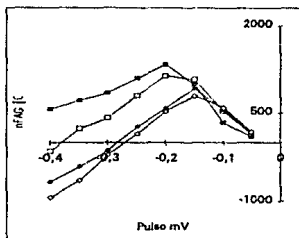
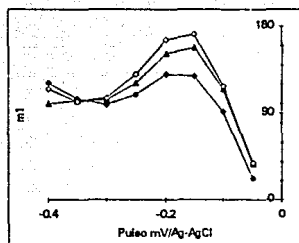


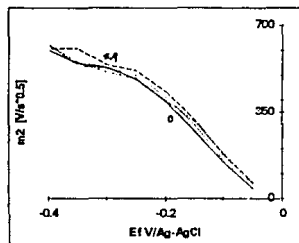
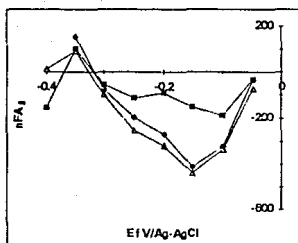
Fig. 3.2.4.2 Carga de exceso superficial de la disolución de oxígeno en los experimentos de CC a diferentes tiempos de adquisición = $\blacksquare 10, \square 20, \blacklozenge 80$ y $\blacklozenge 150$ ms.

3.2.5. Comportamiento de $ES+Enz.$

Para una disolución donde se burbujeó nitrógeno se trazaron los coulogramas respectivos, de los cuales se linealizaron obteniéndose efectivamente líneas rectas. Las figuras 3.2.5.1a y b muestran las pendientes de la linealización de ambos pulsos para diferentes concentraciones de enzima. En la figura 3.2.5.1.a se observa que el incremento de pendiente, se encuentra alrededor de -150 a -200 mV; El "pico" se incrementa conforme $[Enz]$ aumenta. Los posibles causas de este fenómeno pueden ser: catálisis de dismutación del oxígeno remanente en la solución y/o adsorción intensa de los componente de la disolución. La pendiente para el pulso, inverso es prácticamente la misma para todas la concentraciones de enzima.



a)



b)

Fig. 3.2.5a. Pendientes de la líneas rectas de la función O vs $t^{1/2}$ y O_2 vs Θ ; $\tau = 150ms$.
 $(Enz) = \blacklozenge 0, \blacktriangle 3.6$ y $\blacklozenge 5.4 nM$

La figura 3.2.5.2 muestra los valores de nFA_1 para la enzima a $\tau = 150ms$ y diferentes concentraciones de enzima. La interfase sufre nuevamente cambios drásticos: hay en primer lugar una zona de defecto y finalmente una pequeña zona de exceso superficial. Existe un potencial de exceso superficial nulo que se encuentra aproximadamente a $-300mv$. Por los cambios drásticos en los valores de exceso superficial, se corrobora la actividad superficial de la enzima.

Fig. 3.2.5.2 exceso superficial de la enzima SOD
 $\tau = 150ms$, diferentes $[Enz] = 0, \blacktriangledown 3.6$ y $\blacktriangle 5.4 nM$.
 ES + Enz, con burbujeo de N_2 .

3.2.6. Comportamiento de $ES+O_2+Enz$.

Por último se estudió la disolución que contiene oxígeno a saturación, en presencia de SOD. De la representación de O vs $t^{1/2}$ y de O_2 vs Θ se obtuvieron líneas rectas de las cuales sólo se estudiaron los valores de pendiente y ordenada para el pulso directo e inverso.

En los gráficos de la figura 3.2.6.1 se presentan los valores de pendiente m_1 y m_2 . La curva inferior es aquella donde la enzima no está presente. El valor de la pendiente se ve incrementada para las curvas superiores que muestran de manera evidente como la enzima produce un "exceso" de oxígeno en la interfase. Se observa que sólo para valores de $\Delta E < -200$, se produce este incremento, que es en la zona donde se encuentra el proceso difusional del oxígeno. No se tiene una onda bien definida. Los valores de m_2 no se modifican entre sí, ni con respecto a $ES+Enz$.

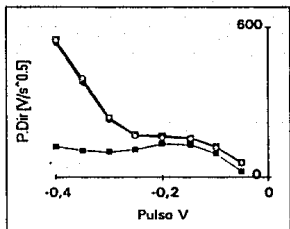


Figura 3.2.6.1 Valores de pendientes de las linealizaciones de pulso directo para el proceso de dismutación catalizada.

$\tau = 150$ ms. $[Enz] = \square$; \blacksquare 1.6 y \circ 5.4 nM.

La figura 3.2.6.2 muestra el valor de carga superficial para el proceso de dismutación a tres diferentes concentraciones de enzima y un valor fijo de tiempo de pulso (150ms). Nuevamente la interfase sufre modificaciones, que se observan por la forma de las curvas. La interfase pasa de un exceso a un defecto y el potencial de exceso superficial nulo es cercano a -300 mV. El comportamiento es similar a $ES+O_2$, aunque la magnitud es menor para $ES+O_2+Enz$.

Se puede concluir que la adsorción de la especie que produce un pre-pico está asociada con la presencia de oxígeno en solución (en el siguiente capítulo se demostrará). La adsorción es tan intensa que modifica de manera evidente la carga de la doble capa. El proceso de adsorción para el O_2 es más intenso que el de la SOD ya que el comportamiento de exceso superficial de las figuras 3.2.5.2 y 3.2.6.2 es el mismo. La presencia de catalasa produce un desplazamiento de la cantidad adsorbida de O_2 y el aumento de pendiente para el proceso de difusional.

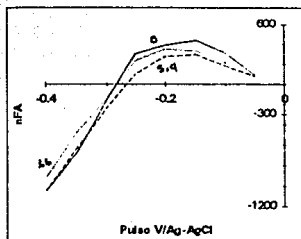


Fig. 3.2.6.2 exceso superficial de las especies que se encuentran adsorbidas al electrodo y que se reducen. disoluciones de enzima a diferentes concentraciones: \circ , 1.6 y 5.4 nM.

Puesto que se han demostrado los efectos de cada una de las especies en la interfase, se propone realizar experimentos de tensometría con el fin de corroborar la adsorción de la enzima SOD en diferentes condiciones de trabajo.

3.3 Tensametría.

3.3.1 Marco teórico.

En esta sección no se realizaron preconcentraciones de SOD en electrolito soporte (ya que la cantidad de enzima era muy limitada). Con el objeto de corroborar adsorción de enzima, oxígeno y la posible existencia de un fenómeno de adsorción/desorción, cuando ambos están presentes, se realizaron estudios tensamétricos en diferentes condiciones.

3.3.2 Condiciones de medida.

Todas las condiciones operatorias, en esta sección, fueron similares a las realizadas en los experimentos tensamétricos con catalasa. Las tensametrías se trazaron, a grosso modo, de la siguiente manera:

- Para conocer el valor promedio de corriente de pico y su reproducibilidad; se trazaron 3 voltamperogramas de una disolución de $ES+O_2$, a saturación. Los potenciales de inicio y final fueron de 150 y -600 mV respectivamente. El potencial de inicio corresponde al valor máximo permitido por el límite de oxidación del mercurio. En el potencial final se encuentra el sistema, en condiciones de máximo gradiente difusional (corriente limitada por difusión).
- Posteriormente se agregó SOD hasta alcanzar una concentración de 5.4 nM aproximadamente; que es la concentración máxima con que se trabajó.
- Se trazaron tensametrías con $E_p = 150$ mV y $t_p = 15$ s constantes. El tiempo t_1 (variable) fue de: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 y 300 segundos. El significado de E_{op} , t_1 y t_2 se ha discutido en la sección 2.3.1.
- La manera de realizar las tensametrías en condiciones convectivas y de preconcentración fueron las siguientes:
 - i) circuito cerrado sin agitación (tensametría modificada).

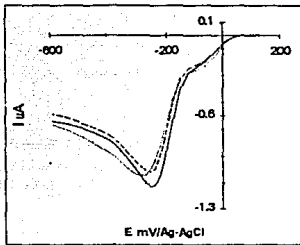
- ii) circuito abierto con agitación (tensametría modificada).
- iii) circuito cerrado con agitación (tensametría normal).

3.3.3 Comportamiento de $ES+O_2+Enz$.

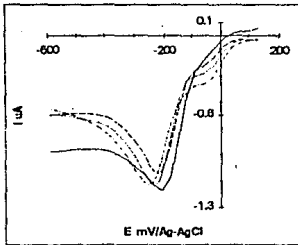
La figura 3.3.3.1 muestra las curvas tensamétricas obtenidas en las condiciones que se enumeraron en la sección 3.3.2. Se observa en las tres condiciones de medida, la existencia de dos señales. El pico mayor que aparece a -250 mV, corresponde a la reducción de oxígeno. La corriente de pico (i_p) vs $v^{1/2}$ sigue la ley de Randles Sevcik (véase la figura 3.4.3 de la siguiente sección). La señal pre-pico que se encuentra al pie de la reducción de O_2 , se encuentra a -100 mV (figura 3.3.3.1). La corriente del pico de mayor intensidad disminuye y el potencial de pico se hace más catódico conforme el tiempo de preconcentración aumenta. La forma y magnitud de estos cambios dependen de la forma en que se realizó la preconcentración.

- Por la aparición del pre-pico en ausencia de enzima, se concluye que éste, está relacionado con el oxígeno (figura 3.4.2.1 de la siguiente sección).
- De la figura 3.3.3.1.i, se observa que hay una adsorción natural de la enzima, que modifica las corrientes de pico y pre-pico (sobre todo del primero).
- Cuando se cierra el circuito, figura 3.3.3.1.ii, existe un aumento en la corriente de pre-pico conforme aumenta t_1 , lo contrario ocurre para el pico de reducción.
- Una constancia en los dos corrientes se observa para las curvas de la figura 3.3.3.1.iii, lo que significa posible saturación de la interfase por fenómenos de adsorción.

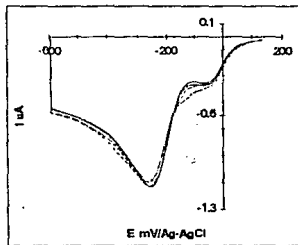
En la tabla 3.3.3.1 se muestran los valores de corriente de la señal pre-pico y de la corriente de pico de reducción de oxígeno en las tres condiciones de medida. Apartir de los valores de la tabla se observó:



i)



ii)



iii)

Fig. 3.3.11 Curvas tensamétricas de oxígeno en presencia de enzima en las condiciones i), ii) e iii) a t_1 variable; $t_2 =$ constante de 15s; V_{ap} de 150 mV.

| Cond. | i) | | ii) | | iii) | | |
|-------|-------|---------------|-----------|-------|-----------|-------|--|
| | t_1 | i_p | i_{pds} | i_p | i_{pds} | i_p | |
| | s | microamperios | | | | | |
| 0 | 0.910 | 0.210 | 0.910 | 0.210 | 0.910 | 0.210 | |
| 30 | 0.897 | 0.233 | 0.867 | 0.258 | 0.823 | 0.247 | |
| 60 | 0.862 | 0.218 | 0.836 | 0.302 | 0.777 | 0.353 | |
| 90 | 0.863 | 0.247 | 0.809 | 0.321 | 0.759 | 0.371 | |
| 120 | 0.782 | 0.278 | 0.807 | 0.321 | 0.716 | 0.374 | |
| 150 | 0.749 | 0.237 | 0.770 | 0.320 | 0.710 | 0.380 | |
| 180 | 0.759 | 0.236 | 0.810 | 0.350 | 0.686 | 0.394 | |
| 240 | 0.772 | 0.238 | 0.780 | 0.360 | 0.665 | 0.415 | |
| 300 | 0.794 | 0.256 | 0.759 | 0.371 | 0.642 | 0.398 | |

Tabla 3.3.11 Valores de i_p y de i_{pds} "adsorción" de la señal pre-pico en las condiciones i) y ii).

• para las condiciones i) el intervalo de corriente pre-pico es de $0.223-0.256\mu\text{A}$, mientras que para el de pico es de $0.897-0.794\mu\text{A}$ respectivamente. La magnitud de los cambios en cada una de las corrientes es pequeña cuando hay una concentración natural.

• cuando las condiciones son ii), el intervalo de corriente pre-pico (i_{pds}) es de $0.258-0.371\mu\text{A}$, mientras que para el de pico es de $0.862-0.759\mu\text{A}$ respectivamente. Los cambios en las corrientes son graduales conforme t_1 aumenta.

• en condiciones son iii), el intervalo de (i_{pds}) es de $0.247-0.398\mu\text{A}$, mientras que para (i_p) es de $0.823-0.652\mu\text{A}$. En esta parte se observa un cambio grande para las dos corrientes a t_1 pequeños, pero cuando t_1 aumenta, tienden asintóticamente a un valor constante tanto la i_{pds} como i_p .

Se concluye en esta parte que la adsorción tanto de la enzima como del oxígeno se incrementa con agitación e imponiendo potencial, se llega a una saturación de la interfase que no permite que i_{pds} siga aumentando. Con las evidencias anteriores de intensa adsorción del oxígeno y de SOD se procede a realizar experimentos de voltamperometría lineal.

3.4 Voltamperometría de barrido lineal de potencial.

3.4.1 Marco teórico.

A pesar de no poder realizar los experimentos de polarografía clásica por falta de enzima SOD se procedió a realizar mediciones en VL. El significado de E_p , i_p , i_{pads} , E_p y $E_{p/2}$ se han discutido en secciones anteriores.

En la figura 3.4.2.1 se presenta el voltamperograma obtenido para la disolución de O_2 0.218mM sobre ECSM en medio fosfatos pH=7.8, 0.1M. En el voltamperograma se observan dos señales: un pico que aparece a un valor aproximado de potencial de -300mV (pico I) y otra señal a un valor de potencial de -100mV (pico II). Si se realiza el barrido con agitación en las mismas condiciones se observa que el pico I se modifica, el pico II prácticamente no cambia, se podría decir que el pico I está controlado por la difusión y la especie es soluble. El pico II posiblemente no está controlado por difusión.

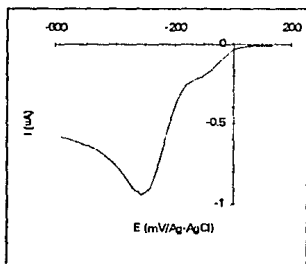


Fig 3.4.2.1 Voltamperograma característico para O_2 a saturación: 0.218mM, ES pH=7.8, 0.1M y $v=50$ mV/s.

3.4.2. Condiciones de medida.

- Una serie de voltamperogramas se trazan a diferentes velocidades de barrido de potencial entre 5-250mV/seg con el propósito de estudiar la evolución de ambas señales.
- para cada una de las velocidades anteriores se agrega enzima tal que en disolución la $[Enz]$ sea de: 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8 y 5.4nM.

3.4.3. Comportamiento de $ES+O_2$.

La figura 3.4.3.1 muestra el comportamiento de la reducción del oxígeno a diferentes velocidades de barrido.

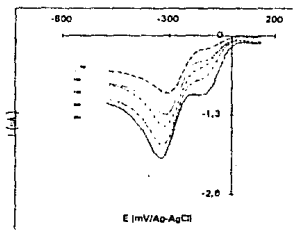


Fig 3.4.2.2) Reducción de oxígeno a diferentes velocidades de barrido de potencial ES pH=7.8 0.1M.

Se observa que los dos picos aumentan en magnitud con la velocidad de barrido. Sin embargo el aumento relativo de el pico II es mayor.

En la figura 3.4.3.2 se muestran los registros de corriente de pico en función de $v^{1/2}$. El comportamiento para el pico I y el corresponden a líneas rectas. La línea superior representa al pico I; la inferior, el pico II; la intermedia, la diferencia entre ellas. Las dos reducciones podrían

estar controlados por difusión en el intervalo de v trabajadas; sin embargo, es importante notar que existe un valor de ordenada al origen en la línea superior, lo que nos indica que el proceso difusivo tiene presencia de fenómenos de adsorción.

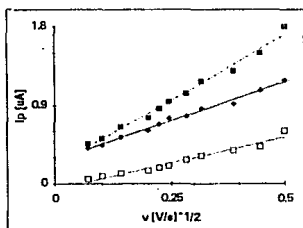


Fig. 3.4.3.2 Representación de i_p vs $v^{1/2}$ para los dos procesos de reducción: \blacksquare i_p de reducción de O_2 (pico I) e \square $i_{p_{ad_2}}$ (para el pico II).

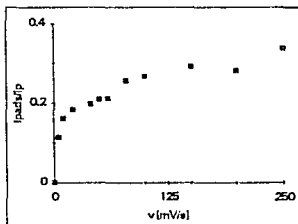
Con el fin de conocer el carácter de los dos respuestas, se realizan las gráficas de relación de pico en función de v y de $v^{1/2}$. Los parámetros anteriores, son importantes para caracterizar procesos de adsorción en voltamperometría cíclica y lineal; donde existen procesos de adsorción de las especies involucradas en el proceso de transferencia de electrones.^{51,71}

La figura 3.4.3.2 muestra la variación de la relación de corriente del pico para el proceso adsorbtivo $i_{p_{ad_2}}$ (pre-pico, pico II) y del proceso difusivo (i_p , pico I) en función de v y de $v^{1/2}$. La figura 3.4.3.2.a muestra los valores de la relación del pico de adsorción en función de v . Se observa que hay un comportamiento asintótico y tiende a un valor constante conforme v se incrementa. El comportamiento anterior es característico para los procesos:

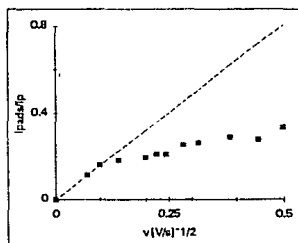
- reacción química acoplada
- proceso de adsorción intenso

La figura 3.4.3.2.b. la relación de corriente en función de raíz cuadrada de barrido de potencial. La curva muestra que la relación, aumenta de manera asintótica conforme $v^{1/2}$. La desviación del comportamiento lineal; es propia de:

- un sistema donde existe adsorción de la especie electroactiva y su producto, pero más intensa para el segundo. Lo anterior confirma los resultados de CC.



a)



b)

Fig. 3.4.3.2. Relación de corrientes de adsorción (pre-pico) y del proceso difusivo: $i_{p_{ad_2}}/i_p$ en función de: a) v ; b) $v^{1/2}$.

3.4.4. Comportamiento de $ES+O_2+Enz$.

Al realizar los experimentos en presencia de enzima; se encuentra que los dos fenómenos (adsorción y catálisis) siguen llevándose a cabo y los valores de corriente se ven modificados por [Enz], en las diferentes velocidades de barrido. La representación de i_p y de i_{pads} vs [Enz] para cada v, nos proporcionan sendas líneas rectas (todos los valores de coeficiente de correlación son cercanos a la unidad). Como es impráctico presentar todas las rectas, sólo se mostrarán los valores de pendiente, ordenada al origen para cada v.

La tabla 3.4.4.1 presenta los valores de ordenada al origen y pendiente; de la representación de i_p y de i_{pads} vs [SOD] para diferentes velocidades de barrido.

| v | i_p | | i_{pads} | |
|-------|--------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | FEMD mV/s | ORD $\mu\text{mol/l}$ | FEMD μA | ORD $\mu\text{mol/l}$ |
| 0.005 | 0.03 | 0.44 | 0.02 | 0.05 |
| 0.010 | 0.04 | 0.52 | 0.03 | 0.08 |
| 0.020 | 0.05 | 0.63 | 0.09 | 0.17 |
| 0.040 | 0.07 | 0.90 | 0.09 | 0.27 |
| 0.050 | 0.08 | 0.98 | 0.11 | 0.260 |
| 0.060 | 0.09 | 1.06 | 0.17 | 0.30 |
| 0.080 | 0.10 | 1.20 | 0.24 | 0.38 |
| 0.100 | 0.12 | 1.32 | 0.26 | 0.46 |
| 0.150 | 0.14 | 1.60 | 0.44 | 0.68 |
| 0.200 | 0.15 | 1.85 | 0.59 | 0.83 |
| 0.250 | 0.18 | 2.05 | 0.68 | 1.08 |

Tabla 3.4.4.1. Valores de pendiente y ordenadas al origen de las representaciones de i_p vs [SOD] para los dos picos y para la resta de ambos. $r > 0.93$ para la mayoría de las rectas.

- se observa por el valor de las pendientes que la enzima SOD produce un efecto catalítico. Esto es muy importante ya que permite demostrar la existencia del superóxido aún en fase acuosa. El

superóxido es muy inestable, según Argese¹¹⁴ y Divisek¹, la velocidad de descomposición catalizada por el disolvente es de $8 \cdot 10^4$, lo cual confirma que la velocidad de dismutación de superóxido provocada por la enzima es mayor que la descomposición de superóxido en agua.

- los ordenados al origen de las rectas de i_p se incrementa. El incremento en los ordenados es una muestra que la enzima se adsorbe en la interfase.
- el valor de la pendiente para las rectas i_{pads} también se incrementa; este incremento confirma lo mencionado en el párrafo anterior.

También, de manera paralela, se realizaron las gráficas de i_p contra $v^{1/2}$ a diferentes valores de [SOD]; obteniéndose líneas rectas en la mayoría de los casos con un coeficiente de correlación mayor a 0.98. La tabla 3.4.2.2 presenta los valores de pendiente y ordenada al origen de las rectas i_p vs $v^{1/2}$.

| Pend. y ord. de las rectas i_p vs $v^{1/2}$ | | |
|---|------------|----------------------|
| [SOD] | FEMD mV | ORD μA |
| 0.0 | 2.30 | 2.15 |
| 0.3 | 2.07 | 2.34 |
| 0.6 | 2.29 | 2.35 |
| 0.9 | 2.38 | 2.99 |
| 1.2 | 2.41 | 2.39 |
| 1.5 | 2.57 | 2.37 |
| 1.8 | 2.64 | 2.37 |
| 2.4 | 2.89 | 2.79 |
| 3.0 | 2.94 | 2.49 |
| 3.6 | 2.77 | 2.62 |
| 4.2 | 2.94 | 2.69 |
| 4.8 | 2.77 | 2.84 |
| 5.4 | 2.85 | 2.68 |

Tabla 3.4.2.2. Valores de pendiente y ordenada al origen de la representación de i_p vs $v^{1/2}$ a diferentes concentraciones de enzima.

Es importante hacer notar; que los valores de pendiente (m) y ordenado al origen (b) aumentan en cada una de las curvas de manera directa con $[SOD]$. En el caso de b es lógico se dé un incremento, ya que se trata de catálisis química de dismutación; pero en m , no es tan evidente. En este caso; el proceso catalítico se ve favorecido a v pequeñas; casi no se detecta a v altas. Lo cual provoca disminución de m a $[Enz]=\text{constante}$. A concentraciones mayores SOD , la pendiente de las rectas i_p vs $v^{1/2}$ debieron ser menores.

El principal problema para el cálculo de la constante de dismutación; es la intensa adsorción que se manifiesta del oxígeno y su producto de reducción. La técnica que puede tener una posible ventaja es la polarografía; por su diferente ventana de tiempo y la gran cantidad de microelectrodos que utiliza en cada barrido de potencial. El principal problema de ella es la necesidad de utilizar concentraciones mayores de enzima, cosa que impidió al autor, realizar un estudio más completo.

En esta parte del trabajo sólo se logró poner de manifiesto el proceso de catálisis y de adsorción por diferentes técnicas electroquímicas. Se comprobó que el superóxido es un intermediario en la reducción del oxígeno y que por su gran inestabilidad no se manifiesta en técnicas lentas como la V_L o los v aquí considerados. El orden de la velocidad de dismutación de superóxido, a diferentes concentraciones de enzima, es mayor que $8 \cdot 10^7$. Lo que demuestra que ambas enzimas estudiadas son extremadamente rápidas.

CAPITULO IV:

CONCLUSIONES

4.0 Conclusiones.

En este trabajo se realizaron algunos cálculos utilizando $n=2$ para la primera reducción de oxígeno; aunque, de la literatura se conoce que todas las transferencias electrónicas son de un electrón. Esto es posible ya que existen reacciones químicas acopladas y el proceso global puede visualizarse de manera diferente; sobre todo si la forma de perturbar el equilibrio es lenta. Lo anterior se aplica al proceso de reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno con técnicas lentas como la polarografía, ya que la velocidad de dismutación del ión superóxido es muy grande.

4.1.1 Conclusiones del capítulo II.

• De los resultados obtenidos en todos los experimentos del capítulo II se deducen las siguientes conclusiones:

- La CC muestra que: El ES se adsorbe. Véanse b_1 y b_2 en la tabla 2.2.3.1, que provoca que $nFAI_1 \neq nFAI_2$, Lo anterior concuerda con los estudios de Parsons & Zobel.²³ La capacitancia no es constante, como consecuencia del proceso de adsorción.

La molécula de oxígeno se reduce irreversiblemente, (fig 2.2.4.1), en la figura 2.2.4.2, se observa la "onda" de un proceso difusional. El oxígeno y su producto son adsorbidos en el ECMS ya que $I_1 \neq I_2$ (tabla 2.2.4.1).

La enzima catalasa no es electroactiva y se adsorbe de manera específica y preferencial en ECMS.

- La tensometría confirmó la adsorción de la enzima y su dependencia con t_1 , t_2 y C_{op} .
- En polarografía, la constante de dismutación catalizada es variable en cada uno de los modelos utilizados. La velocidad disminuye con la cantidad de catalasa:

debido a adsorción del oxígeno y catalasa. Se manifiesta una competencia entre la adsorción y el proceso catalítico.

- En voltamperometría lineal ocurre el mismo fenómeno de "competencia". Se controla la adsorción intensa, ya sea del O_2 y/o su producto de reducción.
- La velocidad determinada para la reacción catalizada por la catalasa no puede ser exacta y confiable. A pesar de ello, el valor obtenido en polarografía y VL es cercano a los que se encuentran publicados en la literatura por otras técnicas.

4.1.2 Conclusiones del capítulo III.

En el caso de ES $pH=7.8$, donde se estudió la enzima SOD,

- Por CC se encontró que el ES también se adsorbe específicamente. La capacitancia no es constante, sobre todo a τ pequeños (fig 3.2.3.a y 3.2.3.b).

El oxígeno y su producto de reacción se adsorben específicamente de manera intensa (figura 3.2.4.2)

La enzima SOD presenta una adsorción menor, debido a su gran volumen (3.2.5.2).

- En tensometría se manifestó la adsorción intensa del producto de la reducción del oxígeno por la posición del pre-pico. El pre-pico de adsorción se incrementa con la agitación y t_1 a $v=cte$. (figura 3.3.3.1).
- Por voltamperometría se diagnosticó la adsorción intensa del O_2 y de su producto de reducción (figuras 3.4.2.2, 3.4.3.2.a y 3.4.3.2.b), corroborando los resultados de CC y algunos datos de la literatura²³.

Debido a la intensa adsorción no se pudo calcular el valor de la constante de dismutación, sin embargo sí fue posible hacer una estimación de la k y poner en evidencia la existencia de

superóxido. El valor de la constante es mayor de $8 \cdot 10^3$. El autor considera que las constantes evaluadas por los autores mencionados anteriormente, deben considerarse "condicionales" ya que dependen completamente de la cantidad de TPPO en solución.

Sugerencias importantes:

- Es necesario establecer nuevas relaciones que tomen en cuenta la adsorción.
- Es muy importante realizar estudios de la doble capa siempre que se haga electroquímica, sobre todo, cuando se trabaja con macromoléculas orgánicas para tener certidumbre en los resultados.

4.2 Bibliografia.

1. Divisek, J.; Kastening, B. *J. Electroanal Chem* 65 603 (1975).
2. Sawyer, T.; Chiericola, G.; Angelis, C.; Nanni, E.; Tsuchiya, I. *Anal Chem* 54 1720 (1982).
3. Sawyer, T.; et al *J. Am Chem Soc.* 100. (1978), 627
4. Wood, P. M. *Trends Biochem Sci* 12 250 (1987)
5. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. *Trends Biochem Sci* 11 250 (1986)
6. Deby, C. *Memo Chimica* 11. (1991), 286-294
7. Sumner, J.B. & Dounce, A.L. *Science* 121. (1937), 366-67
8. Sumner, J.B. & Dounce, A.L. *J. Biol Chem* 127. (1939), 439-47
9. Stern, K.G. *J. Biol Chem* 112. (1936), 661-63
10. Merril, M.; Sawyer, D. *J. Org. Chem* 35 2157 (1970)
11. Sumner, J.B. & Crokin *J. Biol Chem* 125. (1938), 33-36
12. Tanford, C. & Lourien R. *J. Am Chem Soc.* 84. (1962), 892-96
13. Chance, B. *J. Biol Chem* 180. (1949), 947-59
14. Chance, B. *J. Natur* 161. (1948), 914-17
15. Chance, B. *J. Biol Chem* 179. (1949), 1311-19
16. Bonnichsen, R.K, Chance, B. & Theorell, H. *Acta Chem Scand* 1. (1947), 685
17. Deisseroth, A.; Dounce, A. *Physical Chem* 50 319 (1970).
18. Chance, B. Sies, H.; Boveris, A. *Physical Rev* 59 527 (1979).
19. Bonnichsen, R.; Chance, B. *Acta Chem Scand* 1 685 (1947).
20. Chance, B. *Acta Chem Scand* 1 236 (1947).
21. Aebi, H. *Methods of enzymatic analysis* II Verlag-Chemie 673 1983.
22. Rigo, A.; Rolino, G. *J. Biol Chem* 244 6049 (19)
23. Bonniater, J.; Bonniater, W. *Methods Enzymol* 105 88 (1984).
24. Nicholls, P. & Schonbaum, R. *"The Enzymes"* Academic Press 149 (1975).
25. Rigo, A.; Vojna, P. *Anal Biochem* 68 1 (1975).
26. Kaulecky, J.; Brdicka, R.; Hanus, V. *Collection Czechoslov Chem Commun* 18 1611 (1953).
27. Jacob, E. *Z. Chem* 4 189 (1989).
28. Glen, I.; Pence, D. I.; Rooman, C. L. *Anal Chem* 57 1365 (1985).
29. McCord, J.; Fridovich, I. *J. Biol Chem* 244 6049 (1969).
30. McCord, J.; Fridovich, I. *J. Biol Chem* 243 5753 (1968)
31. Eisner, L. *Methods of Enzymatic Analysis* V. 2 Ed. Verlag-Chemie, N. Y. 1974.
32. Dolphin, D.; James, B.; Webson, C. *Electrochemical and Spectrochemical Studies of Biological Redox Components* Am. Chem. Soc. 564 (1982)
33. Valentine, J.; Walszto, A.; Sawyer, D. *Methods Enzymol* 105 71 (1984).
34. Sawyer, D.; Nanni, E.; Roberts, J. *Electrochemical and Spectrochemical Studies of Biological Redox Components*, 585 (1982)
35. Forshey, P.; Kuwana, T.; Kobayashi, N.; Oso, I. *ibid* 601 1982
36. Roberts, J. & Sawyer, D. *J. Am Chem Soc.* 103. 712 (1981)
37. Hyland, K.; *Anal Biochem* 135 280 (1983).
38. Pederson, C & Frensdorff, A. *J. Inorg Chem Int.* 11. 16 (1972)
39. Dietrich, V.; *Tetrahedron* 29 1629 (1973).
40. Fohé, I. & Orling, F. *Methods in Enzymology* 105, 93 (1984)
41. Zhao, X.; Zhang, T.; Liu, J.; Sun, T. *Analytical Abstracts* 49 100310 (1987).
42. Yamaguchi, S.; *Anal Sci* 5 571 (1989).
43. Crosli, N.; et al *Analytical Abstracts* 49 90308 (1987).

44. Rigo, A.; Rolão, G. *Anal Biochem* **81** 175 (1977)
45. Rigo, A.; Vigiño, P.; Agese, E.; Tereni, M.; Rolão, G. *J. Biol. Chem.* **254** 1759 (1979)
46. Marklund, S. *J. Biol. Chem.* **251** 7504 (1976)
47. Balkou, D. *Biochem. Biophys. Acta Commun.* **36** 898 (1968)
48. Orme-Johnson, W. & Beiner, H. *Biochem. Biophys. Acta Commun.* **36** 905 (1968)
49. Orleman, E. & Kern, D. *J. Am. Chem. Soc.* **75** 3058 (1953)
50. Plombeck, J. *Electroanalytical Chemistry* John Wiley & Sons N. Y. 1982.
51. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods* John Wiley & Sons N. Y. 1980.
52. Weissberger, A.; Rossler, W. *Physical Methods of Chemistry: Parte III. Electrochemical Methods*. John Wiley & Sons, N.Y. 1971.
53. Gokus, Z. *Fundamentals of Electrochemical Analysis*. [Ela Horwood Limited, England 1976]
54. Macdonald *Transient Techniques in Electrochemistry*. Plenum, Press, New York, 1977.
55. Saveant, J. M.; Voneko, E. M. *Electrochim. Acta* **10**, 1905 (1965)
56. Mastroglino, M.; Saja, L.; Saveant, J. *Electrochim. Acta* **13**, 721 (1968)
57. Saveant, J. M.; Voneko, E. M. *Electrochim. Acta* **12**, 629 (1967)
58. Kermiche-Aouanouk, M.; Doquenel, M. *Electrochim. Acta* **10**, 723 (1965)
59. Mastroglino, M.; Saveant, J. M. *Electrochim. Acta* **13**, 751 (1968)
60. Saveant, J. M.; Andrieux, P.; Nojha, L. *J. Electroanal. Chem.* **41** 137 (1973)
61. Nicholson, R. S.; Omsted, M. L. *Anal. Chem.* **41** 863 (1969)
62. Nojha, L.; Saveant, J. M. *Electroanal. Chem. & Intert. Chem.* **48** 113 (1973)
63. Saveant, J. M.; & Voneko, E. M. *Electrochim. Acta* **8**, 905 (1963)
64. Nicholson, R. S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **36** 706 (1964)
65. Nicholson, R. S.; *Anal. Chem.* **32** 1351 (1964)
66. Swinder, K. & Gen, S. *J. Electroanal. Chem.* **91** 71 (1978).
67. Whiting, L. F. & Carr, P. W. *J. Electroanal. Chem.* **81** 1 (1977).
68. Amalare, C. & Saveant, J. M. *J. Electroanal. Chem.* **85** 27 (1977).
69. Amalare, C. & Saveant, J. M. *J. Electroanal. Chem.* **86** 227 (1978).
70. Polcyn, D. S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **38** 376 (1966).
71. Wopchoff, R. & Shain, I. *Anal. Chem.* **33** 1514 (1967).
72. Frumkin, A. & Damaskin B. *J. Electroanal. Chem.* **3** 36 (1962)
73. Parsons, R. & Zobel F. *J. Electroanal. Chem.* **9** 333 (1965)
74. Costa, J. M. *Fundamentos de Electrodox. Química Electroquímica y sus Aplicaciones*. Alhambra, España 1981.
75. Delahoy, P. *Double Layer and Electrode Kinetics*. Interscience Publishers 1965.
76. Guidelli, R.; Corri, D. *Electroanal. Chem.* **14** 245 (1967)
77. Pence, D. I.; Booman, G. L. *Anal. Chem.* **38** 1112 (1966).
78. Booman, G. L.; Pence D. I. *Anal. Chem.* **37** 1366 (1965)
79. Johnson, C. A.; Barnhill, S. *J. Electrochem. Soc.* **33** 1256 (1967).
80. Johnson, C. A.; Barnhill, S. *J. Phys. Chem.* **21** 1637 (1967).
81. Guidelli, R.; Corri, D. *J. Electroanal. Chem.* **13** 35 (1967).
82. Guidelli, R. *J. Phys. Chem.* **22** 3535 (1968).
83. Wiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **24** 4130 (1952).

84. McIntyre, J. D. E. *J. Phys. Chem.* **71** 1196 (1967).
85. Fekálberg, S. *J. Phys. Chem.* **73** 1238 (1969).
86. Fekálberg, J. *J. Phys. Chem.* **73** 238 (1969).
87. Delmasiro, J. R. *Anal. Chem.* **41** 747 (1969).
88. Pence, D.; Delmasiro, J.; Booman, G. L.; et al. *Anal. Chem.* **41** 737 (1969).
89. Blount, H.; Winograd, N. & Kurano, I. *J. Phys. Chem.* **74** 3231 (1970).
90. Winograd, N.; Blount, H. H. & Kurano, I. *J. Phys. Chem.* **73** 3456 (1969).
91. Uslrup, J. *Electrochim. Acta* **13**, 1717 (1968).
92. Jensen, P.; Rørdh, M. *Biochim. Biophys. Acta* **132** 171 (1967).
93. Lurie, J. *Handbook of Analytical Chemistry* 7da reimp. Ed. MIR Moscú 1975.
94. Kingdon, A. *Formación de complejos en Química Analítica* 7era imp. Ed. Alhambra España 1979.
95. Sucha, L.; Kolity, S. *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry* N. Y. [Eds. Horwood Limited 1985.
96. *The Merck Index* 10a Ed. Merck & Co., Inc..
97. Lehninger, A. L. *Biochemistry* 2a ed. North Publishers, Inc. N. Y. 1975.
98. Sanchez-Balazero, *Química Electroanalítica*. Alhambra, España.
99. Bocaris J. O'M. *J. Chem. Educ.* **60** 265 (1983).
100. Bocaris, J. O'M.; Reddy, A. K. *Modern Electrochemistry* V. I y II 3a imp. Ed. Plenum Rosetta 1977.
101. Conway, B. E.; Bocaris, J. O'M. *Modern Aspects of Electrochemistry*. Plenum Press, N.Y. 1979.
102. Bocaris, J. O'M.; Khan, S.U. *Quantum Electrochemistry*. Plenum Press, N.Y. 1979.
103. Siankovich, M. T.; Bard, A. J. *J. Electroanal. Chem.* **86** 189 (1978).
104. Christie, J. H. J. *Electroanal. Chem.* **13** 79 (1967).
105. Anson, F. C. *Anal. Chem.* **38** 54 (1966).
106. Christie, J. H.; Osleryoung, R.; Anson, F. *J. Electroanal. Chem.* **13** 236 (1967).
107. Anson, F. C. *Anal. Chem.* **36** 932 (1964).
108. Christie, J. H. *Anal. Chem.* **38** 51 (1966).
109. Murray, R. W. & Gross, D. J. *Anal. Chem.* **38** 392 (1966).
110. *J. Electroanal. Chem.* **65** 193 (1975).
111. Christie, J. H.; Lauer, G.; Osleryoung, R. *J. Electroanal. Chem.* **7** 60 (1964).
112. Christie, J. *Anal. Chem.* **25** 1979 (1963).
113. Moco, J. & Bustin, D. I. *J. Electroanal. Chem.* **29** 307 (1977).
114. Agese, F.; De Caré, B.; Orsega, E.; Rigo, A.; Rolino, G. *Anal. Biochem.* **132** 110 (1983).
115. Gilbert, H. S. *Anal. Biochem.* **132** 50 (1984).
116. -Anson, F. C.; Barclay, D. J. *Anal. Chem.* **40** 1791 (1968).
117. -Osleryoung, R. & Christie, J. H. *J. Phys. Chem.* **71** 1348 (1967).
118. -Murray, R. W. & Gross, D. J. *Anal. Chem.* **38** 932 (1966).
119. -Anson, F. C.; Payne, D. A. *J. Electroanal. Chem.* **13** 35 (1967).
120. -Anson, F. C.; Christie, J.; Osleryoung, R. *J. Electroanal. Chem.* **13** 343 (1967).
121. -Barclay, D. J.; Anson, F. C. *J. Electroanal. Soc.* **116** 438 (1969).

ANEXOS

ANEXO A

trabajo se abrevió ET o el símbolo ; para
referencia ER ó y para los auxiliares EA ó

A.1 PARTE EXPERIMENTAL

A.1.1 Material y equipo utilizado.

La figura A.1.1 muestra los dos celdas empleadas para la aplicación de diferentes técnicas electroanalíticas. Cada celda se aísla con cubiertas que permiten la introducción de electrodos y gas.

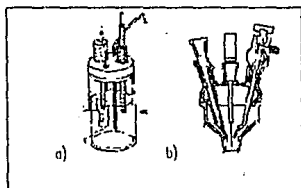


Fig A.1.1.1 Celdas utilizadas: a) con equipo BAS100 (manipulada mediante interfase por computadora) b) con los potencióstatos PAR 171A y de manufactura nacional.

Un sistema de tres electrodos utilizaron todos los equipos electrónicos. Los electrodos fueron varios, a saber: - Trabajo.- gota suspendida (EGSM), goteante (EGM) y de poza de mercurio (EPM).

- Auxiliares.- platino y grafito.
- Referencia.- calomel (ECS, saturado con KCl), plata-cloruro de plata (KCl 1M) y de platino (cuasi-referencia).

En el cuadro de la figura A.1.1.2 se muestra la totalidad de ellos.

Todos los electrodos sólidos fueron adquiridos en diferentes casas comerciales; mientras que el mercurio, de grado polarográfico (Merck). Para designar a los electrodos de

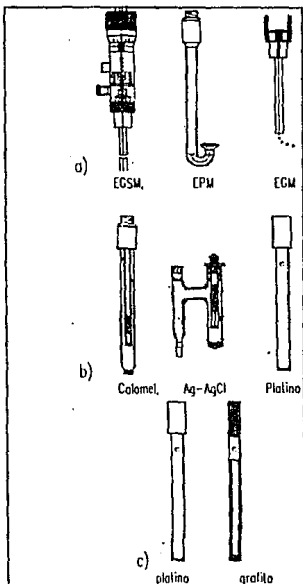


Fig A.1.2. diferentes tipos de electrodos: a) de trabajo, EGM, EPM y EGSM; b) referencia, Hg-Hg₂Cl₂, Ag-AgCl y cuasi-referencia: Pt-Disolución; c) auxiliares, Pt. y C grafito.

En los experimentos, donde hubo necesidad, se desplazó del electrolito al oxígeno por nitrógeno. El nitrógeno comercial (en tonque) se burbujó a través de una disolución de electrolito soporte; antes de pasar al interior de la celda de trabajo. Cuando fué necesaria su presencia se

saturó la disolución con un flujo de aire. La concentración de oxígeno se determinó con un electrodo selectivo.

El material volumétrico utilizado en toda la parte experimental se calibró previamente. Nuevas y específicas fueron todas las puntas eppendorf que se usaron para las adiciones de volúmenes pequeños.

El equipo electrónico fué variado:

- Potenciostato marca PAR modelo 174A
- Analizador Electroquímico marca BAS modelo 100
- Potenciostato marca Metrohm modelo Palarecord 626
- Potenciostato de Fabricación Nacional (Universidad de Guanajuato)
- Medidor de oxígeno marca YSI modelo 54A
- Graficador XY marca PAR modelo RE0150

Los esquemas de trabajo se representan en la figura A.1.1.3 para las diferentes técnicas electroanalíticas.

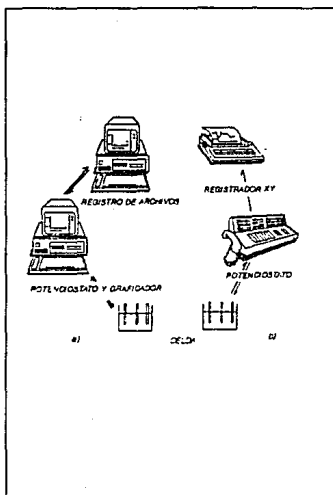


Fig. A.1.1.3 Esquemas de trabajo: a) voltamperométrica, lensamétrico y cronocoulombométrica b) voltamperométrico y polarográfico

A.1.2 Reactivos y disoluciones:

Para la preparación del electrolito soporte y los reactivos se utilizó agua desionizada. Los reactivos fueron de grado analítico: KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y H_2O_2 30% p/v. Fueron adquiridos de Sigma, la enzima catalasa EC 1.11.1.6 (polvos purificados de hígado de bovino) y superóxido-dismutasa SOD EC 1.15.1.1 (polvos liofilizados de rábano). Las enzimas se disolvieron en electrolito de fosfatos; que es el medio recomendado para su disolución. Se usaron las enzimas inmediatamente para evitar la desnaturalización y, consecuente, pérdida de actividad.

El volumen inicial de electrolito fué de 13 ml. Para evitar cambios importantes en el volumen, y por tanto en las concentraciones: se pipetearon todos los reactivos con micropipetas y puntas eppendorf.

ANEXO B

B.0 Técnicas electroanalíticas.

La electroquímica analítica es una metodología muy completa ya que posee diferentes técnicas. Se dividen, según su respuesta en función del tiempo, de manera general en: estacionarias, no estacionarias y pseudo-estacionarias. Las estacionarias presentan convección y superficie electródica constante; su respuesta no varía con el tiempo. Se dice presentan un régimen estacionario, (RDE). La voltaperometría con disco giratorio y disco-anillo son técnicas estacionarias. En las no estacionarias no existe convección, aunque, la superficie es constante. La respuesta es función del tiempo y en condiciones de régimen no estacionario, (RDNE). Los cronómetros y voltperometría lineal y triangular son ejemplos de ello. Entre las anteriores se encuentran las técnicas pseudoestacionarias: donde existe convección pero la inconstancia de superficie provoca que la respuesta dependa del tiempo. Se dice régimen pseudo-estacionario (RPE). Todas las polarografías presentan estas características.

B.1 Polarografía clásica.⁵⁰⁻⁵⁴

La polarografía emplea un electrodo de mercurio, metal líquido, que fluye por el interior de un tubo capilar y que cee por acción gravitacional o por medio de un martillo. Es una técnica pseudo-estacionaria debido al crecimiento y renovación constante de la superficie electródica. En la figura B.1.1 se presenta el programa de potencial impuesto, superficie de la gota y respuesta típica de polarograma de la disolución saturada con oxígeno.

La corriente producida por reacción electroquímica es proporcional a la concentración de especie electroactiva. La forma, tamaño y valor de potencial en que aparecen es función

de: especie, disolvente, electrolito, temperatura, número de electrones, velocidad de transferencia de electrones... entre otros. La ecuación que rige la variación de corriente límite de difusión i_d en función de la concentración C_0^* , corresponde a la ley de Ilkovic⁵⁴:

$$i = 607nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C_0^*$$

Koutecky realizó correcciones de la ecuación anterior por efecto de esfericidad y propuso la siguiente relación⁵¹:

$$i = 607nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C_0^* \left(1 + K \frac{D^{1/2}t^{1/6}}{m^{1/3}} \right)$$

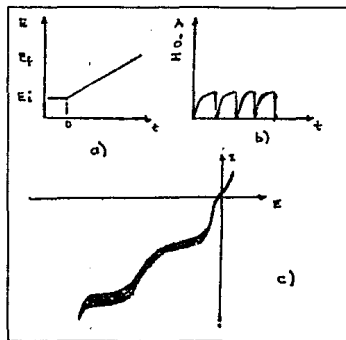


Fig. B.1.1 a) programa de potencial b) perfil de superficie de gota. c) Polarograma de E.S. de fosfatos (pH=7.0, 0.1M) saturado con oxígeno [O₂]=0.218mM. Sistema de electrodos (Rcobmet C.A.P.; ET/EGM. tiempo de goteo 1 segundo, a temperatura ambiente.

Ecuación que se utilizó para calcular el coeficiente de difusión de las especies en este trabajo. El valor de $K=39$ según datos en la literatura. Ver en la sección de simbología las unidades de cada término; D_0 , C_0 , m , y t_{max} representan el coeficiente de difusión y concentración de la especie electroactiva, flujo de mercurio y tiempo de goteo respectivamente.

B.2 Cronocoulombimetría de pulso inverso.⁹⁸⁻¹²¹

Es una técnica no estacionaria. En ella se aplica un pulso de potencial durante un tiempo τ (al que se llama tiempo de adquisición o de pulso directo) para luego, invertirse por un período de tiempo semejante. La respuesta obtenida es la cantidad de carga que pasa a través del sistema durante la perturbación. La fig B.2.1.a muestra el programa de potencial al que se somete la interfase Hg/electrolito durante los experimentos de cronocoulombimetría de pulso inverso. Generalmente el potencial de inicio (E_i) corresponde al potencial de corriente nula; el potencial final (E_f), al potencial donde el proceso electroquímico está limitado por la velocidad de difusión de especie electroactiva.

Si existe reacción electroquímica, la ecuación que rige la variación de cantidad de carga (Q)—que pasa por el sistema— en función del tiempo, corresponde a la ley de Cottrell integrada. Durante el pulso directo:

$$Q_f (0 \leq t(\tau) = \left(\frac{2nFAD^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}} \right) \tau^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_1$$

donde Γ_1 es el exceso superficial de especie adsorbida en un proceso de reducción; por definición, el exceso superficial es la diferencia del número de moles de una especie entre la interfase y el seno de la disolución por unidad de área: $\Gamma_1 = [(n_1 - n_1^*)/A]$. Q_{dl} es la carga utilizada en la doble capa y los demás símbolos tienen el significado habitual. La figura A.2.1.b muestra un cronocoulograma típico de

pulso inverso, obtenido con el programa de potencial de la figura A.2.1.a.

Con el fin de facilitar el cálculo del aporte por exceso superficial y doble capa se analiza la variación de Q_f con $t^{1/2}$. Esta variación sigue una línea recta con ordenada al origen igual a $Q_{dl} + nFA\Gamma_1$. Con el valor de Q_{dl} obtenido por análisis de electrolito soporte solo, se puede calcular el valor de Γ_1 , para las demás disoluciones. Se define en este trabajo $Q_{dl} + nFA\Gamma_1 = Q_{sup1}$. La figura B.2.1.c muestra la linealización para el pulso directo.

Del análisis del valor de la pendiente se puede deducir si existe reacción electroquímica y se observa que depende de la concentración y coeficiente difusional. Se espera que la pendiente se incremente con el tamaño de pulso de potencial hasta llegar al condiciones límites, a partir de ahí se mantiene constante.

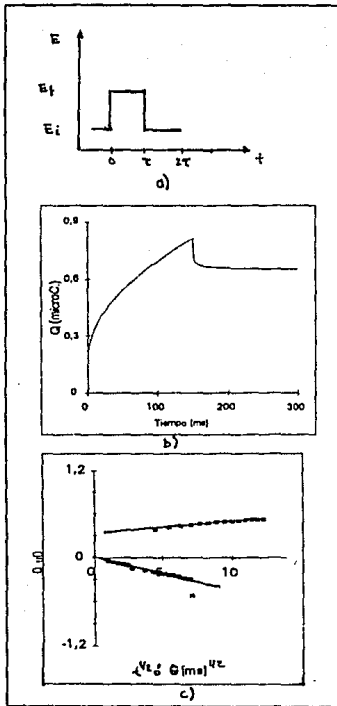


Fig A.2.1. a) Programa de potencial impuesto al electrodo en los experimentos de Cronocoulometría. b) Curva típica obtenida con el programa de potencial. c) Linealización del pulso directo e inverso.

reactivo y el producto se adsorben (pero la especie reductora en menor intensidad):

$$Q_2(t) = \left[1 + \left(\frac{a_0 n F A \Gamma_2}{Q_2} \right) \right] \left(\frac{2 n F A D^{1/2} C_0^*}{\pi^{1/2}} \right) \Theta + Q_d + a_0 n F A \Gamma_2$$

donde Γ_2 es el exceso superficial de especie adsorbida en el pulso inverso; $a_1 = cte = 0.97$, $a_0 = cte = -0.069$ (los valores de los constantes anteriores fueron calculados teóricamente y verificados de manera experimental por sus autores¹⁰⁴); $Q_d = Q(t)$; y el parámetro tela, $\Theta = \tau^{1/2} + (t - \tau)^{1/2} - t^{1/2}$.

De la misma manera se lineariza la respuesta representando la variación de Q_2 con Θ . La ordenada al origen corresponde a: $Q_{d1} + a_0 n F \Gamma_2$, que definiremos como Q_{sup2} , y que es muy importante para evaluar los excesos superficiales. En la figura B.2.1.c se presenta la linealización del pulso inverso.

De la comparación de los valores de ordenadas al origen y con ayuda de experimentos de "extrusión" es posible evaluar tanto Γ_1 como Γ_2 a diferentes valores de potencial y para los diferentes disoluciones. El experimento de extrusión consiste en realizar los cronocoulogramas de electrolyto soporte y conocer la magnitud de carga utilizada en la doble capa. Como ya mencionamos la pendiente se puede considerar como un criterio existencia de transferencia electrónica de la especie electroactiva. Durante este trabajo continuamente se hace referencia de los indicadores; pendiente y ordenada al origen obtenidos de la linealización de los cronocoulogramas.

Se indica a continuación la ecuación, para el pulso inverso, de la reducción; donde el

B.3 Voltamperometría de barrido lineal de potencial.

Dentro de las técnicas no estacionarias se encuentra la voltamperometría de barrido lineal de potencial (VL). En esta técnica la variable más importante es la velocidad de barrido de potencial. En la figura B.3.1. se muestra el tipo de perturbación y la respuesta característica obtenida por efecto de tal programa de perturbación.

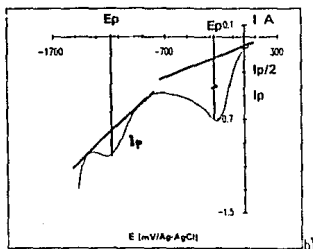
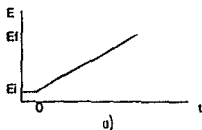


Fig B.3.1. a) Programa de potencial utilizado en voltamperometría lineal (VL). b) voltamperograma típico del electrodo soporte (Hg/Hg₂⁺/HVO)²⁺. 0.1M pH=7 saturado con O₂.

El potencial inicial de barrido de potencial (E_i), es frecuentemente el potencial de corriente nula. El potencial final (E_f) se selecciona de tal manera que se encuentre, después del máximo, en la región donde la corriente sea prácticamente constante; ya que el proceso está limitado por difusión y la corriente ya no depende de la velocidad de barrido.

Los parámetros más importantes de la curva I/E, medibles, se muestran en la figura anterior y son: E_i, E_f, E_p y E_{p/2}; potencial de inicio, final, de pico y de pico medio respectivamente; i_p, i_{p/2}; corriente de pico y de medio pico.

Randles y Sevcik⁵¹ propusieron la siguiente relación entre la corriente de pico y otros parámetros; como lo son: concentración y velocidad de barrido, para un sistema rápido:

$$i_p = (2.99 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_0^*$$

para un sistema electroquímico lento la expresión anterior se convierte en:

$$i_p = (2.99 \cdot 10^5) n(n\alpha) v^{1/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_0^*$$

Reinmuth⁵¹ corrigió la ecuación anterior por efecto de esterilidad en el electrodo de gota suspendida de mercurio, obteniendo:

$$i_p = i_p(\text{plana}) \cdot 7.25 \cdot 10^6 \cdot \left(\frac{n D A C_0}{t_0} \right)$$

Existen tablas en diferentes publicaciones para realizar la corrección de corriente de pico^{71,78}.

Con el fin de evaluar la transferencia electrónica, se han efectuado estudios muy completos por varios autores, en los cuales se relaciona E_p, i_p con la velocidad de barrido de potencial. Nicholson & Shain^{81,84,85,70,71} fueron los primeros en sistematizar las relaciones de E_p e i_p con v ó v^{1/2}; con el fin de caracterizar los procesos electroquímicos donde existen reacciones químicas acopladas.

Más tarde Savéant y colaboradores^{55,57,60,62,63,68,69} propusieron el uso de zonas de predominio de estado para la mejor

comprensión y sistematización de los procesos electroquímicos de acuerdo a sus tiempos ventana. En los diagramas de zona de predominio de estado se grafica: $\log K$ vs $\log \lambda$, constante de equilibrio y parámetro adimensional de cinética homogénea (específica para cada reacción química acoplada) respectivamente.

La voltamperometría y las ecuaciones diferenciales pueden ser muy sencillas o muy complicadas dependiendo de los objetivos que se deseen alcanzar.

experiencias tensamétricas. La gota debe renovarse en cada ensayo.

Nótese que existen dos tiempos muy importantes:

- tiempo de preconcentración (t_1), que puede ser variable, con agitación e imposición de potencial.
- tiempo de reposo (t_2), en este caso fijo, de 15s sin agitación y con imposición de potencial.

B.4 Tensametría⁷²⁻⁷⁵.

La Tensametría es una técnica muy importante para poner de manifiesto el efecto de la adsorción de alguna especie electroactiva y/o no electroactiva^{72,73}. Es alterna y complementaria a la cronocoulombimetría, ambas son no estacionarias. Los experimentos de tensametría se realizan en las condiciones siguientes: en la disolución de electrolito soporte se lleva a cabo una concentración de especies contenidas en él mediante la imposición de potencial. El potencial aplicado (E_{ap}) modifica la tensión superficial de la interfase y con ello la posible adsorción de componentes de la disolución. Para asegurarse de que la cantidad de especie adsorbida solo dependa de la tensión superficial y no de la velocidad con que llega la interfase, se agita la disolución durante un periodo de tiempo (t_1), llamado de preconcentración. Con el interés de que sólo se manifiesten los procesos de superficie, se interrumpe la agitación para llegar a condiciones de RDNE (anexo B). Durante el tiempo de reposo (t_2) se mantiene el potencial E_{op} . Se realiza un barrido de potencial de E_{op} hasta la barrera catódica después del tiempo $t = t_1 + t_2$.

En este trabajo la velocidad de barrido de potencial fué de 50 mV/s en todos los experimentos de tensametría. La figura B.4.1.a muestra el programa de potencial impuesto en las

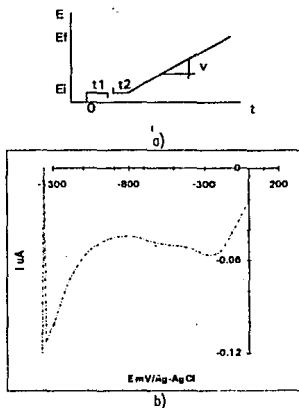


Fig. B.4.1 a) Programa de potencial aplicado para estudios tensamétricos. t_1 : tiempo de preconcentración; t_2 : tiempo de reposo, sin agitación b) Curvas tensamétricas para diferentes tiempos de preconcentración t_1 : i) 0; ii) 60; y iii) 120 s. Concentración de catálisis 10^{-8} M, t_2 constante de 15s, Buffer de fosfatos 0.1M, pH=7.0 sin oxígeno, vel. de barrido de pot.: 50 mV/s.

El objeto del tiempo de preconcentración es concentrar a la especie que se adsorbe a un valor particular de potencial y con ello evaluar su actividad superficial. El tiempo de reposo, permite al sistema alcanzar la condición no convectiva. En

la figura B.4.1.b se muestran curvas típicas como respuesta de preconcentración, en la interfase, de enzima catalasa a diferentes valores de I_1 (fosfatos 0:1M, pH=7.0).

La respuesta lensométrica es similar a la de voltamperometría lineal, ya que se realizan en condiciones no estacionarias; con la salvedad de que se realiza una preconcentración de especies en la interfase electrodo. Un análisis de i_p (corriente de pico de adsorción) en función de C_0 , t_1 y t_2 , proporciona información cualitativa valiosa para el entendimiento de la interfase Hg/disolución.

B.5 Ecuaciones diferenciales del proceso de dismutación.

El autor no dedujo las ecuaciones sólo se limitó a presentarlas de la manera más entendible posible ya que fueron publicadas en la literatura. La mayoría de las ecuaciones presentadas para calcular la velocidad de reacción proceden de las condiciones de frontera establecidas aquí; sin embargo, la forma final depende de cada técnica de medida y de sus parámetros fundamentales.

Las reacciones electroquímicas y química de dismutación, en este trabajo, respectivamente son:



Z especie no electroactiva

El problema del valor límite para un mecanismo de segundo orden, regeneración de la mitad del reactivo y con difusión esférica semi-infinita (ECSM) es la siguiente:

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D_O \left[\frac{\partial^2 C_O}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_O}{\partial r} \right] + \frac{k C_R^2}{2} \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_R \left[\frac{\partial^2 C_R}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_R}{\partial r} \right] - k C_R^2 \quad (2)$$

$$t = 0; r \geq r_0; C_O = C_O^* \quad (3a)$$

$$C_R = 0 \quad (3b)$$

$$t > 0; r = r_0; C_O = 0 \quad (4)$$

$$D_O \frac{\partial C_O}{\partial r} = -D_R \frac{\partial C_R}{\partial r} = \frac{i(t)}{nFA} \quad (5)$$

si se hace la transformación:

$$\psi = 2C_O + C_R \quad (6)$$

asumiendo la igualdad de los coeficientes de difusión:

$$D_O = D_R = D \quad (7)$$

el problema del valor límite es convertido en:

$$\frac{\partial \psi}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 \psi}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \psi}{\partial r} \right] \quad (8)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 C_R}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_R}{\partial r} \right] - k C_R^2 \quad (9)$$

$$t = 0; r \geq r_0; \psi = 2C_O^* \quad (9a)$$

$$C_R = 0 \quad (9b)$$

$$t > 0; r = r_0; \psi = C_R \quad (10a)$$

$$\frac{\partial \psi}{\partial r} = - \left[\frac{\partial C_R}{\partial r} \right] = \frac{i(t)}{nFAD} \quad (10b)$$

La solución para la concentración de ψ por el método de transformada de Laplace proporciona:

$$(C)_{r=r_0} = \left(2C_0^* - \frac{1}{nFAD^{1/2}} \right) *$$

$$\int_0^t i(u) \left[\frac{1}{\sqrt{\pi(t-u)}} - \frac{D^{1/2}}{r_0} E \left(\frac{D^{1/2}}{r_0} \sqrt{(t-u)} \right) \right] du \quad (11)$$

$$E(x) = \exp(x^2) \operatorname{erfc}(x) \quad (x)$$

$\operatorname{erfc}(x)$ denota el complemento de la función error. Si la reacción química de segundo orden es muy rápida se establece un estado estacionario. En compensación con la difusión y reacción química. La ecuación (2) para R en las condiciones de frontera es:

$$D \frac{\partial^2 C_R}{\partial r^2} = kC_R^2 \quad (12)$$

$$t = 0; r \geq r_0; C_R = 0 \quad (13)$$

$$t > 0; r = r_0; \frac{\partial C_R}{\partial r} = \frac{i(t)}{nFAD} \quad (14)$$

La ecuación (12) puede integrarse para producir una expresión del flujo de R que con las ecuaciones (15) y (16), nos proporcionan la concentración de R en la superficie:

$$(C_R)_{r=r_0} = \left[\frac{3}{2Dk} \right]^{1/3} \left[\frac{i(t)}{nFA} \right]^{2/3} \quad (15)$$

de las ecuaciones (5), (11) y (15), se obtiene la concentración de O_2 en la interfase:

$$(C_O)_{r=r_0} =$$

$$C_0^* - \left[\frac{3}{16Dk} \right]^{1/3} \left[\frac{i(t)}{nFA} \right]^{2/3} - \frac{1}{2nFAD^{1/2}} *$$

$$\int_0^t i(t-u) \left[\frac{1}{\sqrt{\pi u}} - \frac{D^{1/2}}{r_0} E \left(\frac{D^{1/2} u^{1/2}}{r_0} \right) \right] du \quad (16)$$

Si la condición (4a) se aplica a (16) se encuentra la siguiente ecuación integral no lineal para la corriente límite

$$\left[\frac{3}{2DkC_0^*} \right]^{1/3} \left[\frac{i(t)}{nFAC_0^*} \right]^{2/3} \frac{1}{2nFAC_0^* \sqrt{D\pi}} *$$

$$\int_0^t i(u) \left[\frac{1}{\sqrt{t-u}} - \sqrt{\frac{\pi D}{r_0^2}} \frac{D^{1/2}}{r_0} \sqrt{t-u} \right] du = 2 \quad (17)$$

esta ecuación se convierte en adimensional haciendo las siguientes sustituciones

$$V = kC_0^* u \quad (18)$$

$$i_0(T) = nFAC_0^* \sqrt{\pi DkC_0^*} \Phi(T) \quad (19)$$

$$T = kC_0^* t \quad (20)$$

$$\left[\frac{3\pi}{2} \right]^{1/3} [\Phi(T)]^{2/3}$$

$$+ \int_0^T \Phi(V) \left[\frac{1}{\sqrt{T-V}} - \sqrt{\pi} Q E [Q\sqrt{T-V}] \right] dV = 2 \quad (21)$$

$$Q = \frac{1}{r_0} \left[\frac{D}{kC_0^*} \right]^{1/2} \quad (22)$$

Finalmente se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{i_a}{i_d} = \frac{\pi T^{1/2} \Phi(T)}{1 + \sqrt{\pi T Q}} \quad (2)$$

Las ecuaciones (1) y (2) en polarografía para dismutación son las siguientes:

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D_o \left[\frac{\partial^2 C_O}{\partial r^2} + \frac{2r}{3t} \frac{\partial C_O}{\partial r} \right] + \frac{k C_R^2}{2} \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_o \left[\frac{\partial^2 C_R}{\partial r^2} + \frac{2r}{3t} \frac{\partial C_R}{\partial r} \right] - k C_R^2 \quad (2)$$

Todas las expresiones se modifican, ya que las condiciones de frontera (1) y (2) cambian.

Si se considera una reacción catalítica las ecuaciones (1) y (2) se convierten en:

para electrodo de gota suspendida de mercurio (EGSM).

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D_o \left[\frac{\partial^2 C_O}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_O}{\partial r} \right] + k C_R \quad (1')$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_o \left[\frac{\partial^2 C_R}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_R}{\partial r} \right] - k C_R \quad (2')$$

para un electrodo goteante de mercurio (EGM).

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D_o \left[\frac{\partial^2 C_O}{\partial r^2} + \frac{2r}{3t} \frac{\partial C_O}{\partial r} \right] + k C_R \quad (1'')$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_o \left[\frac{\partial^2 C_R}{\partial r^2} + \frac{2r}{3t} \frac{\partial C_R}{\partial r} \right] - k C_R \quad (2'')$$