

00577

2/13/99



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO ELECTROANALITICO DEL
SISTEMA GLUTATION

T E S I S
que para optar por el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(Química Analítica)
presenta:

Q. LUIS GERARDO MARTINEZ JARDINES



México, D.F.

1999

TESIS CON
RALLA DE ORIGEN

274636



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María Antonia Dosal Gómez
VOCAL: Dr. Alberto Rojas Hernández
SECRETARIO: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
PRIMER SUPLENTE: Dra. María del Pilar Cañizares Macías.
SEGUNDO SUPLENTE: M. En C. Julio Cesar Aguilar C.

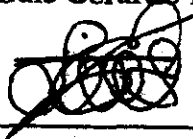
LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Química Analítica,
Laboratorio Anexo 3F, Edificio A, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dr. Alejandro Baeza Reyes.



Sustentante: Q. Luis Gerardo Martínez Jardines.



CON MUCHO AMOR,

A MI ESPOSA Y

A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Baeza por su enseñanza y confianza.

A la Dra. Silvia Castillo Blum, por su amistad y apoyo.

A los miembros del jurado, por sus valiosos comentarios.

A CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A DGEP por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A todos y cada uno de mis amigos que siempre me han apoyado.

A la Facultad de Química de la UNAM.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	3
1. Introducción	4
2. Antecedentes	5
2.1 Importancia del glutatión en los procesos metabólicos	5
2.2 Metabolismo del glutatión	6
2.3 Procesos en los que interviene el glutatión	7
2.4 Procesos electroquímicos del glutatión	12
2.4.1 Oxidación de compuestos tiolados	13
2.4.2 Reducción de compuestos tiolados	13
2.5 Procedimientos Analíticos para determinar glutatión	13
2.5.1 Análisis por vía húmeda	14
2.5.2 Análisis enzimáticos	14
2.5.3 Análisis espectrofotométrico	15
2.5.4 Análisis cromatográficos	15
2.5.5 Análisis electroquímicos	16
2.5.6 Análisis con biosensores	16
2.6 Biosensores electroquímicos	18
2.6.1 Clases de biosensores electroquímicos	19
2.6.1.1 Sensores potenciométricos	20
2.6.1.2 Sensores amperométricos	21
2.7 Técnicas electroquímicas	21
2.7.1 Generalidades	21
2.7.2 Voltamperometría cíclica	24
2.7.2.1 Fundamentos de voltamperometría cíclica	24
2.7.3 Cronoamperometría	30
2.7.4 Potenciometría	37

2.7.4.1. Electrodo indicador	38
2.7.4.2. Clasificación de los electrodos	39
2.7.4.3. Electroodos de ion selectivo	39
3. Objetivos	41
4. Sección Experimental	42
4.1 Reactivos	42
4.2 Preparación de disoluciones	42
4.3 Equipos y materiales	45
4.3.1 Electrodos	45
4.3.2 Celda de trabajo	46
4.3.3 Equipos utilizados	47
4.4 Descripción de los experimentos realizados	47
4.4.1 Formación del electrodo de película de mercurio (TLME)	47
4.4.1.1 Formación del TLME sobre disco de cobre	47
4.4.1.2 Formación del TLME sobre disco de oro	49
4.4.1.3 Concentración de $[Hg(II)]_T$	50
4.4.2 Voltamperometría cíclica	51
4.4.2.1 Dominio de electroactividad	51
4.4.2.2 Voltamperometría cíclica de GSH	52
4.4.2.3 Voltamperometría cíclica de GSSG	52
4.4.2.4 Voltamperometría cíclica del complejo glutación-mercurio	53
4.4.3 Formación de la capa glutación-mercurio por cronoamperometría de doble pulso	53
4.4.3.1 Programa de perturbación empleado en cronoamperometría	54
4.4.3.2 Cronoamperometría de doble pulso	55
4.4.3.3 Cronoamperometría de doble pulso con dos ciclos	55

4.4.4 Eficiencia del electrodo de capa del complejo glutatión-mercurio	57
4.4.4.1 Determinación de la ecuación de Nikolsky	57
4.4.5 Determinación de la constante de selectividad	58
4.4.6 Estudio del tiempo de respuesta del electrodo del complejo glutatión-mercurio	59
5. Análisis de resultados y discusión	60
5.1 Formación del TLME sobre electrodo de disco de cobre	60
5.2 Formación del TLME sobre electrodo de disco giratorio de oro	62
5.3 Caracterización del sistema GSH/GSSG y de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ por voltamperometría cíclica	75
5.3.1 Dominio electroactivo	75
5.3.2 Estudio de GSH	76
5.3.3 Estudio de GSSG	79
5.3.4 Estudio del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$	79
5.4 Complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$	80
5.4.1 Enlace Mercurio-Glutatión	80
5.4.2 Estudio estérico de la formación de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$	81
5.5 Formación de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ por cronoamperometría de doble pulso	83
5.5.1 Programa de perturbación	83
5.5.2 Cronoamperometría de doble pulso	84
5.5.3 Cronoamperometría de doble pulso cíclica	87
5.6 Relaciones de Nikolsky, $[E]_{i=0} = F(\log c)$, para el electrodo de capa $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$	89
5.6.1 Caso de GSH como analito	89
5.6.1.1 Resultados obtenidos con el electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre TLME 1.	89

5.6.1.2 Resultados obtenidos con el electrodo de capa de [Hg(GS) _x] formado sobre TLME 2.	92
5.6.2 Caso de GSSG como analito	93
5.7 Coeficiente de selectividad para el sistema GSH/GSSG con el electrodo de capa del complejo [Hg(GS) _x]	95
5.8 Tiempo de estabilización de la respuesta del electrodo de capa del complejo [Hg(GS) _x]	97
6. Conclusiones	99
Anexo I. Tablas de resultados experimentales	100
Anexo II Análisis estadístico de los resultados experimentales	104
Anexo III. Curvas de calibración	107
Referencias	116

Abreviaturas

A = área de la superficie del electrodo
[cm²]

AA = aminoácido

ATP = adenosintrifosfato

α_i = actividad de la especie i

%C.V. = % coeficiente de varianza

C_O = Concentración del oxidante

C_R = Concentración del reductor

CYSH = cisteína

D = coeficiente de difusión

DTNB = ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)

E = potencial de electrodo [V]

E^0 = potencial normal [V]

E^0 = potencial formal [V]

$E_{1/2}$ = potencial de media onda [V]

E_0 = potencial de inicio de barrido [V]

E_1 = potencial de inversión de barrido [V]

E_2 = segundo potencial de inversión [V]

E_p = potencial de pico [V]

E_{ind} = potencial del electrodo indicador [V]

$E_{unión}$ = potencial de unión líquida [V]

E_{ref} = potencial del electrodo de referencia [V]

E_{X1} = primer potencial impuesto

E_{X2} = segundo potencial impuesto

EGD = electrodo giratorio de disco

EDTA = ácido

ENH = electrodo normal de hidrógeno.
etilendiaminotetraacético

F = constante de Faraday

GLU = glutamato

GLY = glicina

GSH = forma reducida del glutatión

GSSG = forma oxidada del glutatión

HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución

I = corriente, símbolo general [A]

I_p = corriente de pico [A]

ISE = electrodo ion-selectivo

k = constante de velocidad

$k_{pot}^{A,B}$ = coeficiente de selectividad

donde B interfiere con A

M = molaridad [molL⁻¹]

m = cantidad mol transformada en un proceso electroquímico

n = número de electrones

involucrados en un proceso redox

N.A. = número de Avogrado

NADPH = nicotinadeninadifosfato
ácido

NEM = N-etilmaleimida

O = especie oxidante

pH = logaritmo negativo de la actividad del ion hidrógeno
Q = carga sobre un electrodo [C]
R = especie reductora
R = constante de los gases
RSH = especie tiolada reducida
RSSR = especie tiolada oxidada
 r_0 = radio del electrodo [cm]
SCE = Electrodo estándar de calomel
t = tiempo [s]
 τ = lapso de tiempo de aplicación del pulso en cronoamperometría.
TLME = electrodo de película de mercurio

V = volt
VC = voltamperometría cíclica
 V_0 = volumen total de la disolución
Z = especie no electroactiva
 γ_R = coeficiente de actividad de la especie R.
 γ_O = coeficiente de actividad de la especie O.

RESUMEN

En esta tesis se presenta el desarrollo de métodos para la obtención de un biosensor, selectivo a la molécula de glutatión, constituido por una capa de complejo glutatión-mercurio formada en la superficie de un electrodo de película de mercurio (TLME).

La primera etapa del proyecto se basó en la construcción de un TLME con las características adecuadas para la formación de la capa del complejo glutatión-mercurio. El procedimiento se llevó a cabo sobre dos matrices diferentes: la primera, una matriz de cobre y la segunda un electrodo de disco de oro sobre las cuales se deposita el mercurio por electrólisis bajo ciertas condiciones experimentales (pH, agitación, $[Hg(II)]_T$).

Posteriormente, se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica de la forma reducida (GSH) y oxidada del glutatión (GSSG) utilizando los TLME construidos. Este estudio se realizó con el objetivo de poner en evidencia los procesos al electrodo del glutatión y determinar las condiciones experimentales (t , concentración y agitación) adecuadas para la formación de la capa del complejo glutatión-mercurio.

La siguiente etapa experimental consistió en el estudio de la formación del complejo glutatión-mercurio mediante cronoamperometría de doble pulso.

Finalmente, se determinó la eficiencia del electrodo utilizando las ecuaciones de Nikolsky y se obtuvo su coeficiente de selectividad a partir de los experimentos potenciométricos.

1. INTRODUCCION

El glutatión es una biomolécula que se encuentra en tejidos animales y vegetales a concentraciones bajas, tanto en su forma oxidada como reducida. Esta molécula está asociada a diversos procesos metabólicos directamente relacionados con el daño celular, por lo que la cuantificación del glutatión es de gran importancia en medicina y biotecnología.

En las técnicas analíticas convencionales para la cuantificación del glutatión (HPLC y espectroscopía) es necesario el tratamiento de la muestra previo al análisis. Este tratamiento que generalmente consiste en el aislamiento de la especie en estudio involucra varias etapas y cada una introduce fuentes de error. Además de que en muestras biológicas el tratamiento y la cuantificación del GSH deben ser inmediatos para evitar o minimizar la degradación del analito.

Existen técnicas analíticas alternativas que minimizan el tratamiento de la muestra previo a la cuantificación, como es el caso de la electroquímica y en particular los biosensores

En años recientes se ha estudiado la electroquímica del glutatión.¹ Entre los estudios realizados se incluye la formación de una capa del complejo glutatión-mercurio sobre la superficie de una película delgada de mercurio previamente depositada sobre alguna matriz (por ejemplo, electrodo de disco de oro, cobre, o algún otro material). La capa formada por el complejo presenta ciertas características que la hacen responder selectivamente a la concentración del glutatión. La realización de estudios más detallados acerca de estos procesos permitirán el diseño de un biosensor selectivo a glutatión.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del Glutati3n en los Procesos Metab3licos.

El glutati3n (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) existe en la naturaleza en su forma oxidada (GSSG) y en su forma reducida (GSH) (Figura 2.1), adem3s es el tiol predominante en tejidos animales.^{2,3} El trip3ptido tambi3n se encuentra presente en muchos fluidos fisiol3gicos (por ejemplo: plasma y bilis),^{4,5} en varios procariotes⁶ y pr3cticamente en todas las c3lulas eucari3ticas (la Entamoeba Histol3tica es una excepci3n⁷).

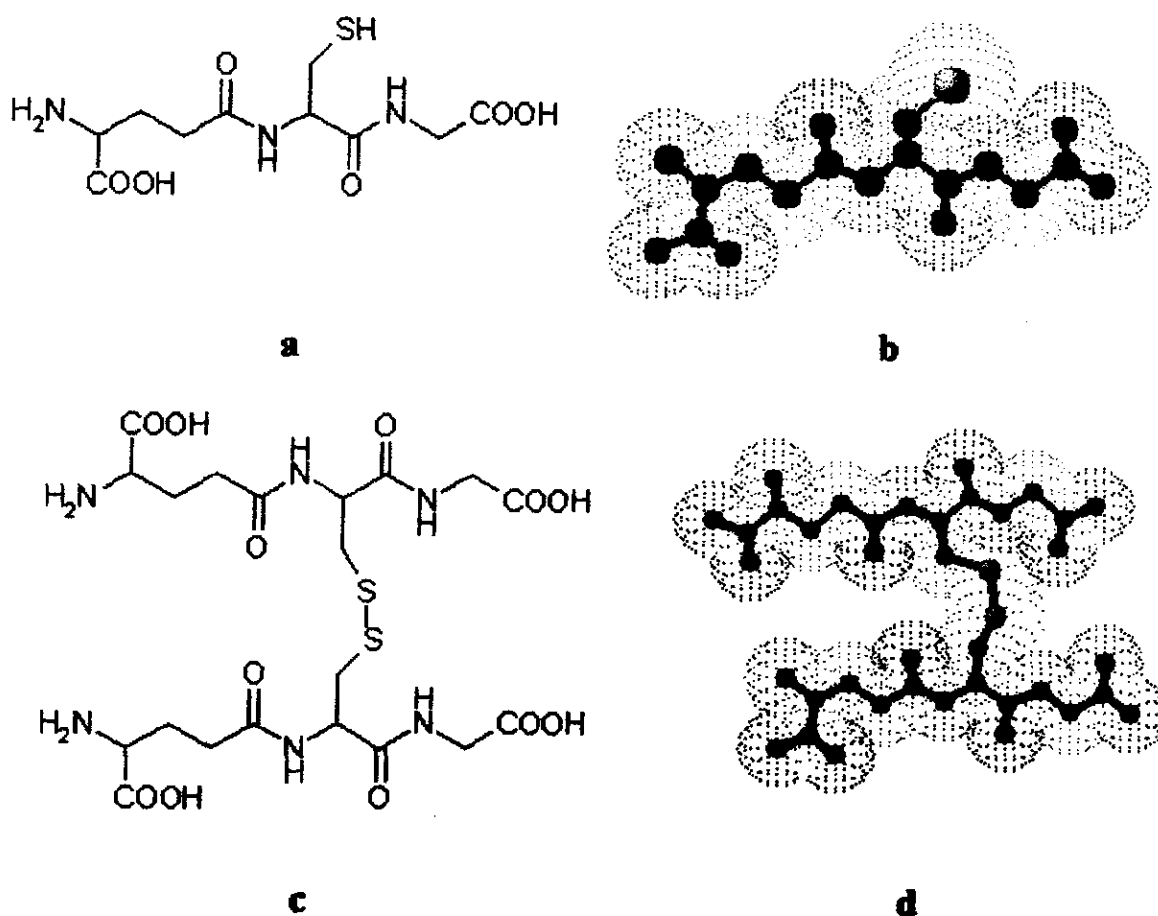


Figura 2.1 Representaciones de la mol3cula de glutati3n: a) f3rmula desarrollada del GSH, b) representaci3n de esferas y varillas del GSH, c) f3rmula desarrollada del GSSG y d) representaci3n de esferas y varillas del GSSG. Esfera roja = ox3geno, azul marino = nitr3geno, azul claro = carbono y amarilla = azufre. Nota: los hidr3genos se han omitido por simplificaci3n.

Las propiedades del glutatión han hecho que ésta molécula sea el tema principal en diversas investigaciones relacionadas con mecanismos enzimáticos, biosíntesis de macromoléculas, metabolismo de intermediarios, metabolismo de drogas, radiación, cáncer, toxicidad por oxígeno, formación de aminoácidos, endocrinología, inmunología y toxicidad ambiental.⁸

2.2 Metabolismo del Glutatión.

El glutatión es sintetizado intracelularmente mediante dos pasos consecutivos, en la primera reacción ocurre la conjugación del glutamato y la cisteína por la γ -glutamilcisteína sintetasa⁹⁻¹² (reacción 1) y posteriormente la glicina se enlaza al dipéptido por la acción de la GSH sintetasa^{9,13} (reacción 2), figura 2.2.

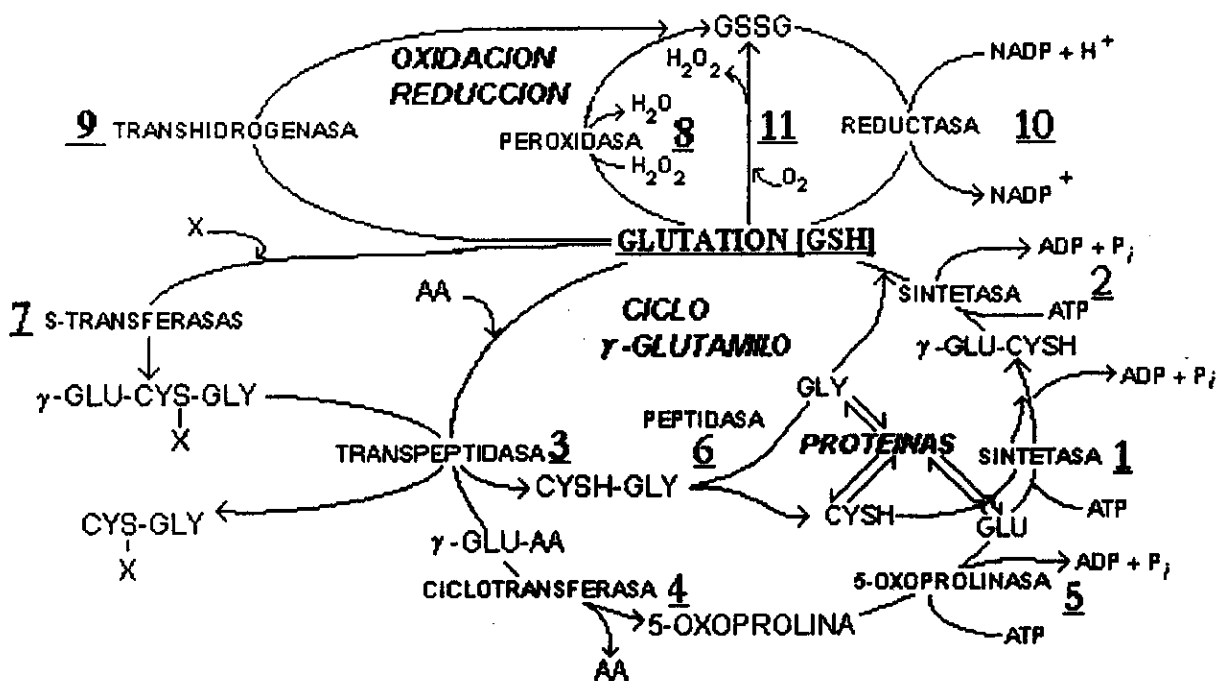


Figura 2.2 Metabolismo del glutatión. Enzimas involucradas: Reacción 1 la γ -glutamilcisteína sintetasa, Reacción 2 GSH-sintetasa, Reacción 3 γ -glutamiltranspeptidasa, Reacción 4 γ -glutamil ciclotransferasa, Reacción 5 5-oxoprolinasa, Reacción 6 dipeptidasa, Reacción 7 GSH S-transferasa, Reacción 8 GSH peroxidasa, Reacción 9 GSH transhidrogenasa, Reacción 10 GSSG reductasa.

La γ -glutamil transpeptidasa^{14,15} metaboliza la degradación de GSH (reacción 3) formando como derivados γ -glutamilo y cisteinilglicina. Los derivados del γ -glutamilo que se forman dentro de la célula son metabolizados por la γ -glutamilciclotransferasa¹⁵ (reacción 4) la cual los transforma a los correspondientes aminoácidos y a 5-oxo-L-prolina. La conversión de la 5-oxo-L-prolina a L-glutamato es metabolizada por la 5-oxo-L-prolinasa (reacción 5). Por otra parte, la cisteinilglicina formada por la transpeptidasa (reacción 3) se descompone por la acción de una dipeptidasa (reacción 6) y los compuestos así formados pueden entrar al ciclo del glutatión o formar parte de alguna proteína. Estas seis reacciones constituyen el ciclo del γ -glutamilo, en el cual se lleva a cabo la síntesis y degradación del GSH.

El GSH puede formar derivados S-sustituidos por acción de la enzima GSH S-transferasa (reacción 7). El compuesto γ -glutamilo resultante es degradado por la acción de la γ -glutamil transpeptidasa (reacción 3) generando los correspondientes cisteinglicinatos S-sustituidos.

La interconversión de GSH y GSSG ocurre por diferentes mecanismos. La glutatión peroxidasa (reacción 8) metaboliza la reducción de H_2O_2 dependiente de GSH, siendo ésta ruta la principal para la reducción de H_2O_2 y de otros peróxidos. Este mecanismo es muy importante en la protección de las membranas lipídicas en contra de la oxidación, ya que los intermediarios O_2 y H_2O_2 son producidos en gran cantidad en los sistemas biológicos.⁸ Muchas funciones metabólicas involucran el intercambio tiol-disulfuros, este proceso en el glutatión es metabolizado por la GSH-transhidrogenasa¹⁷ (reacción 9).

La reducción de GSSG a GSH es metabolizada por la enzima GSSG-reductasa¹⁷ la cual utiliza NADPH (reacción 10). Por otra parte, la conversión extracelular de GSH a GSSG tiene lugar con la participación de O_2 generando H_2O_2 (reacción 11).

2.3 Procesos en los que interviene el Glutatión.

Se conocen diversas funciones directas o indirectas del glutatión en muchos procesos biológicos importantes. Por ejemplo:

i) Transporte del glutatión fuera de las células.

Los niveles intracelulares de GSH en células de mamíferos se encuentran en el intervalo milimolar (0.5 - 10 mM); mientras que, en el plasma sanguíneo se encuentra a niveles micromolares. Gracias a varias líneas de investigación⁸ ha sido posible determinar que la enzima γ -glutamil transpeptidasa es accesible a sustratos externos y se encuentra unida fuertemente a la superficie externa de la membrana celular. El GSH principal sustrato de la enzima γ -glutamil transpeptidasa se ha encontrado en ambos lados de la membrana, lo cual conduce a suponer que el GSH intracelular es transportado fuera de la célula en donde se encuentra la transpeptidasa.¹⁷ En investigaciones realizadas en pacientes con deficiencia de γ -glutamil transpeptidasa¹⁸ se mostró que en ausencia de actividad de la transpeptidasa, cantidades considerables de GSH se acumulan fuera de la célula.

Por otra parte, se determinó que al inhibir la síntesis de GSH los niveles de GSH en el plasma sanguíneo disminuyen. Después de un tiempo los niveles empiezan a aumentar lo que indica un proceso de regeneración de GSH en el plasma. Esto se puede explicar si se considera que existe un flujo apreciable del GSH del hígado hacia el plasma. Los principales órganos involucrados en el proceso de circulación de GSH son el hígado y el riñón.¹⁹

Dentro de la célula el 99 % del glutatión se encuentra en forma reducida por lo que el GSH es la especie principalmente transportada; sin embargo, la forma oxidada GSSG también puede ser transportada fuera de la célula.²⁰

Existe la posibilidad de que el GSH y el GSSG encontrados fuera de las células se relacionen con daños celulares oxidativos. Bajo ciertas condiciones de toxicidad severa o estrés oxidativo, la concentración de GSSG intracelular aumenta sustancialmente existiendo algún mecanismo para su exportación.²¹ Por lo que se sugiere que el transporte activo de GSSG es un mecanismo de emergencia para proteger las células de la propia toxicidad del GSSG.

En general, el transporte de GSH fuera de las células es común. En los mamíferos aparentemente parece ser una forma de transferir sulfuro proveniente de cisteína entre células. El transporte de GSH puede proteger a la membrana celular en contra del daño oxidativo al mantener los grupos-SH esenciales. Otra de las funciones del transporte de GSH hacia la γ -glutamil transpeptidasa es la formación de derivados γ -glutamilo requeridos en otras rutas metabólicas.²²

ii) Papel del glutatión en daños por radiación y por toxicidad de compuestos oxigenados.

En 1944 Guzmán-Barrón²³ se basó en observaciones relativas a la facilidad con que se oxidan los tioles. Propuso que la radiación ionizante puede oxidar fácilmente los grupos tioles encontrados dentro de las células. Más tarde se comprobó que las radiaciones provocan una disminución en la concentración celular de GSH y la formación de GSSG. También se comprobó que la administración de algunos tioles protege a las células animales de los efectos de la radiación.²⁴ Finalmente, muchas observaciones han mostrado que la radiosensibilidad de las células depende de los niveles intracelulares de tioles.⁸

Los efectos de la radiación son mayores en el aire que en condiciones de anoxia. El efecto del oxígeno se puede explicar en términos de la competencia entre el grupo tiol y la molécula de oxígeno por los radicales libres producidos por la radiación.⁸ En otras palabras, la radiación ionizante *subtrae* un hidrógeno de una molécula formando un radical; el grupo tiol se encarga de proveer el hidrógeno a la molécula y el radical tiol *dismuta*. El efecto dañino del oxígeno se puede explicar por el hecho de que el O₂ se transforma dentro de la célula en especies reactivas de oxígeno las cuales son destruidas en gran medida por reacción con el GSH. Bajo condiciones anóxicas, hay una mayor cantidad de GSH disponible para que reaccione con los radicales inducidos por la radiación ionizante. Por lo tanto, existe menor daño ocasionado por la radiación bajo anoxia que en presencia de aire.

El papel del GSH en la prevención de la toxicidad por oxígeno esta muy relacionado con el fenómeno asociado a la radiación.⁸ El oxígeno conduce inevitablemente a la producción de un número de especies reactivas de oxígeno, tales como aniones superóxidos, peróxido de hidrógeno, radicales oxhidrilo, peróxidos orgánicos y radicales libres, resultantes del metabolismo celular. La presencia de estas especies reactivas conlleva a la condición de estrés oxidativo, cuyo efecto de manera continua causa severos daños a la célula a través de peroxidación lipídica y alteraciones en la estructura de proteínas y ácidos nucleicos. Existen ciertos sistemas capaces de prevenir o limitar este daño oxidativo, los cuales son conocidos como antioxidantes no-enzimáticos, entre los cuales se encuentra el glutatión, el ascorbato y el α -tocoferol (vitamina E).⁸ Por otra parte, existen sistemas enzimáticos que eliminan las especies reactivas de oxígeno mediante GSH y ascorbato como aceptores.

En estudios basados en el agotamiento del GSH mediante, el uso de inhibidores tales como las sulfoximinas²⁵ (en especial la sulfoximin butionina), se han demostrado algunas funciones del glutatión en la protección en contra de compuestos con oxígeno reactivo.²⁶ El agotamiento de GSH en células linfoides humanas ocasiona un incremento considerable en la sensibilidad hacia la irradiación. Posteriormente, se sugirió que el agotamiento de GSH provocado por las sulfoximinas era la causa de que las células tumorales resultaran ser más susceptibles a los tratamientos por irradiación y a los agentes quimioterapéuticos.²⁷

Esta clase de estudios presenta evidencia significativa acerca de las funciones del GSH en su acción por destruir radicales libres y en la reducción de especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, estos resultados son congruentes con los encontrados en estudios relacionados con los efectos ocasionados por la radiación, los cuales sugieren que el uso de la sulfoximin butionina es una ayuda muy importante en la terapia con irradiación y en la quimioterapia.²⁸ Este tipo de estudios ha servido para elucidar funciones adicionales del GSH, por ejemplo: la posibilidad de que se encuentre relacionado en el metabolismo de la hormona tiroidal, con la melanina, en el sistema inmune, en la

neurotransmisión, en la estructura y función de microfilamentos y en otros procesos biológicos.⁸

iii) El glutatión y su relación con el cáncer.

En una serie de estudios^{28,29} se han encontrado conexiones significativas entre el GSH y la carcinogénesis. La administración de algunos carcinógenos incrementa los niveles de GSH y de la γ -glutamil transpeptidasa. Algunos tumores (por ejemplo: en piel, hígado y colon) presentan altos niveles inusuales de transpeptidasa.

En su última etapa, las formas reactivas de los carcinógenos son electrofílicas, es decir, candidatos ideales para la detoxicación por reacciones catalizadas por la GSH S-transferasa.

Un descubrimiento de gran interés fue informado por Novi²⁹ quien administró grandes dosis de GSH a ratas con tumores inducidos en el hígado con aflatoxinas notando una substancial regresión de los tumores.

iv) Otros procesos donde interviene el glutatión.

El GSH esta relacionado con una gran variedad de procesos enzimáticos. La actividad de muchas enzimas está influenciada por GSH y algunos otros tioles. Existen además diversas reacciones enzimáticas en las cuales el GSH participa como coenzima.⁸

Muchas funciones metabólicas y fisiológicas involucran el intercambio tiol-disulfuro, por ejemplo: la síntesis y degradación de proteínas así como la síntesis de derivados de deoxiribosa precursores en la síntesis de ADN. Desde hace mucho tiempo se ha pensado que la gran mayoría de estos procesos involucran la participación del GSH ya que como se mencionó anteriormente es el tiol más abundante dentro de las células.

Otro aspecto importante son las enfermedades ocasionadas por la deficiencia de GSH o alguna de las enzimas involucradas en su metabolismo. Por ejemplo, la deficiencia de la GSH sintetasa se caracteriza por una abundante excreción de 5-oxoprolina por vía urinaria, además se incrementa el nivel de este compuesto en la sangre y los fluidos cerebrospinales. También se presenta una severa acidosis metabólica, tendencia a la

hemólisis y disfunciones del sistema nervioso central.⁸ La deficiencia de otras enzimas que participan en el proceso metabólico del GSH ocasionan diversas enfermedades.⁸

Finalmente, existe suficiente evidencia para pensar que el GSH juega un papel importante en la destrucción de intermediarios reactivos de oxígeno, radicales libres y otros compuestos tóxicos producidos constantemente en diversas rutas metabólicas tanto en animales como plantas. Por ejemplo, las plantas al igual que los animales utilizan el GSH como agente destoxicante al conjugarlo con compuestos herbicidas.³⁰

Por otra parte, el GSH es el precursor inmediato en la síntesis de fitoquelatinas, moléculas con la estructura básica $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, que se producen por medio de GSH transpeptidasas y cuya función es esencial en la defensa de las plantas hacia metales pesados.³¹

A pesar de esto, muchos aspectos relacionados con la interconversión de GSH y GSSG requieren un estudio más profundo, por ejemplo el significado de la oxidación extracelular de GSH por O_2 , y la naturaleza y el número de transhidrogenasas. Así mismo, se requiere una mayor exploración relacionada con el sistema inmune, el sistema neurotransmisor y la disminución de los niveles de GSH en los tejidos con la edad.³²

2.4 Procesos Electroquímicos del Glutatión.

Los procesos redox del glutatión han sido estudiados principalmente por polarografía clásica y voltamperometría cíclica.^{1,33-35}

Muchas sustancias que contienen el puente disulfuro (-S-S-) se adsorben fuertemente a la superficie de los electrodos de mercurio.¹ Esta adsorción con frecuencia bloquea la superficie del electrodo impidiendo otras reacciones al electrodo, este hecho hace que su aplicación en análisis *in vivo* sea limitada. Por otra parte, esta adsorción puede aplicarse a la modificación de la superficie del electrodo generando nuevas propiedades redox.

2.4.1 Oxidación de mercurio en presencia de compuestos tiolados.

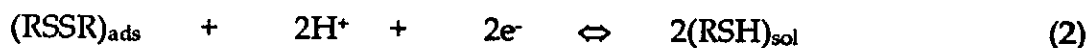
En estudios realizados con electrodos de mercurio se ha comprobado que compuestos tiolados como la cisteína no se adsorben fuertemente a la superficie del mercurio en comparación con sus productos de oxidación. A concentraciones menores a 0.3 mM la reacción de oxidación del mercurio con el tiol RSH es la siguiente:



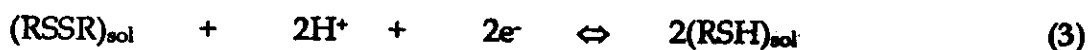
A concentraciones mayores a 0.3 mM se lleva a cabo la reacción anterior con la formación de una monocapa de $[\text{Hg}(\text{RS})_2]$ que recubre la superficie del electrodo a medida que aumentan las interacciones entre las moléculas adsorbidas.³⁶

2.4.2 Reducción de compuestos tiolados.

A partir de estudios de voltamperometría cíclica se ha propuesto que los compuestos del tipo RSSR en una primera etapa se adsorben a la superficie del electrodo siguiendo una reducción con la correspondiente ruptura del puente disulfuro y generando RSH.^{1,36}



Se ha observado que la reacción directa entre el Hg y RSSR, para generar el complejo $[\text{Hg}(\text{RS})_2]$, no ocurre apreciablemente en los experimentos de voltamperometría. Por otra parte, el barrido inverso hace que el $(\text{RSH})_{\text{sol}}$ producido en el primer barrido se oxide de acuerdo a la reacción (1). Es posible, además, que el RSSR no adsorbido en la superficie del electrodo se reduzca a RSH a potenciales más negativos de acuerdo a la reacción:



2.5 Procedimientos Analíticos para Determinar Glutación.

Sin lugar a dudas, el progreso de cualquier área de la química depende en gran medida del desarrollo de metodologías analíticas confiables enfocadas a la caracterización y cuantificación en diversos sistemas.

En la literatura es posible encontrar una gran variedad de métodos empleados para determinar GSH los cuales se pueden clasificar en 7 grupos diferentes.

2.5.1 Análisis por Vía Húmeda.

Las determinaciones hechas en vía húmeda se basan en el uso de reactivos específicos tales como el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), o la N-etilmaleimida (NEM).^{37,38} También se ha utilizado la reducción de nitroprusiato.³⁹ Sedlak realiza la estimación de grupos sulfidrilo con el DTNB dando una estimación rápida de la concentración de GSH; sin embargo, este procedimiento con frecuencia da resultados erróneos.⁴⁰

Las determinaciones fluorimétricas de GSH las cuales utilizan o-ftalaldehído son muy sensibles,⁴¹ pero con incierta especificidad, el uso de o-ftalaldehído a valores altos de pH para determinar GSSG genera resultados erróneos.⁴²

También, se ha utilizado el análisis gravimétrico en la determinación de GSH. El procedimiento general consiste en la precipitación de GSH con alguna sal de metales pesados, por ejemplo, Kolthoff utiliza mercurio,⁴³ Binet utiliza cadmio,⁴⁴ o la precipitación con cobre.⁴⁵

2.5.2 Análisis Enzimáticos.

Las determinaciones enzimáticas de GSH dan resultados más confiables, entre éstas se encuentran aquellas que utilizan la glioxilasa^{46,47} o la combinación de glioxilasa con GSSG reductasa,⁸ determinando al GSH por espectroscopía electrónica. Un tercer método utiliza la GSSG reductasa (basado en la oxidación de NADPH) para medir GSSG.

Además de los métodos que se basan en reacciones estequiométricas, existen los métodos cinéticos los cuales ofrecen una alta sensibilidad. Por ejemplo, la velocidad de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico se mide en un sistema que contiene DTNB, GSSG reductasa, amortiguador de fosfatos, EDTA, NADPH y la muestra.⁴⁸ El nivel de GSH + GSSG presente se determina por comparación de los resultados con una curva de

calibración apropiada. Por otra parte, el procedimiento puede ser específico para GSSG por enmascaramiento del GSH con NEM⁴⁹ o con vinilpiridina.⁴⁸

2.5.3 Análisis Espectrofotométrico.

En determinaciones espectrofotométricas se utiliza la interacción de GSH con la maleilpiruvato isomerasa⁵⁰ y con la formaldehído deshidrogenasa.⁵¹ Existen algunos métodos que utilizan la GSH S-transferasa.⁵² También se han empleado ciertos reactivos para generar productos que puedan ser monitoreados, por ejemplo el uso de DTNB,⁵³ o la 2-vinilpiridina.⁵⁴ Fujita y Namuta reportaron un método colorimétrico basado en la generación de I₂.⁵⁵

2.5.4 Análisis Cromatográficos.

El GSH y el GSSG eluyen muy cerca en sistemas analizadores de aminoácidos los cuales utilizan resinas de intercambio catiónicas; sin embargo, no se resuelven bien de otros constituyentes de los tejidos. La derivación de GSH con 2-vinilpiridina genera un producto que eluye a mayor tiempo en un pico fácil de cuantificar.⁸ La cromatografía de varios derivados tiolados en resinas de intercambio aniónico también es efectiva.⁵⁶ En general se han descrito una gran cantidad de procedimientos que utilizan columnas cromatográficas;⁵⁶ sin embargo, dichos procedimientos no compiten con los métodos de HPLC, de los cuales se encuentran informados en la literatura un número considerable.⁸ Por ejemplo, Schofield utiliza una metodología rápida y sensible que permite determinar GSH y GSSH por HPLC con una columna de sílica amino enlazada,⁵⁷ el método tiene el inconveniente de que se utiliza una extracción en la preparación de la muestra recuperando el 98% de GSH pero solamente el 86% de GSSG. En otro estudio se reporta la determinación de GSH, GSSG, otros tioles y disulfuros por HPLC en nivel nanomolar.⁵⁸ También, se encuentran en la literatura análisis por electroforesis capilar de alta resolución.⁵⁹ Los métodos de HPLC en general son muy sensibles y específicos pero requieren de equipo especializado; no obstante, son muy útiles cuando se desea cuantificar varios tioles en la misma muestra.

2.5.5 Análisis Electroquímicos.

En la literatura es posible encontrar varios métodos electroquímicos;⁸ sin embargo, los electrodos utilizados son sensibles a otras sustancias reducibles que generalmente se encuentran en la matriz de la muestra. Entre los métodos electroquímicos más comunes se encuentran aquellos basados en polarografía clásica⁶⁰⁻⁶² con la restricción de que sólo se aplican en muestras prácticamente puras. Existen métodos alternativos, como por ejemplo el análisis voltamperométrico por redisolución,⁶³ que presenta ciertas ventajas con respecto a la polarografía. Una alternativa más precisa es el uso de electrodos modificados químicamente, por ejemplo, electrodos de carbón químicamente modificados con ftalocianinacobaltato.⁶⁴

2.5.6 Análisis con Biosensores.

El uso de biosensores en la determinación de GSH no ha sido del todo explotado. En la literatura se encuentran contadas investigaciones al respecto. Compagnone y colaboradores⁶⁵ informan del diseño de un biosensor amperométrico para glutatión, basado en un electrodo de peróxido de hidrógeno o de oxígeno tipo Clarck acoplado a la enzima glutatión oxidasa, con lo que obtienen buenos resultados. Posteriormente, el mismo grupo de trabajo acopló el electrodo diseñado a un sistema de flujo enfocado al análisis de GSH en eritrocitos.⁶⁶ Haung y colaboradores⁶⁷ diseñaron un microsensor inmovilizando la enzima glutatión oxidasa sobre un disco de platino cuyo diámetro fue de aproximadamente 30 μm .

La gran mayoría de las técnicas convencionales que se encuentran en la literatura presentan grandes desventajas principalmente en el tratamiento previo de la muestra para su análisis. En un estudio comparativo de las técnicas más empleadas (HPLC, espectrofotometría y análisis enzimático) se puede observar que existe una buena concordancia en los resultados obtenidos, siempre y cuando se utilice un adecuado tratamiento de la muestra.⁶⁸

En general se deben considerar algunos aspectos importantes en la preparación de la muestra. En algunas investigaciones existen datos que sugieren la existencia de mezclas de tioles, disulfuros y proteínas⁸ formadas *post-mortem* en los tejidos analizados; este hecho se debe considerar en el diseño del tratamiento de la muestra. También, es importante considerar factores tales como la frescura de la muestra, los procedimientos de homogeneización y la desproteínización. Para obtener resultados confiables las muestras se deben analizar inmediatamente; por ejemplo, un estudio realizado presentó los siguientes resultados: se analizó el plasma sanguíneo de ratas 3 minutos después de haber obtenido la muestra encontrando niveles entre 19-23 mM de GSH y de 1.5-2 mM de GSSG. Después de 7 minutos se repitió el análisis encontrando niveles de GSH cercanos a de 11mM y a 3 mM de GSSG. El GSH restante se encontró en forma de una mezcla de disulfuros.⁶⁹

Otro de los factores importantes es el pH de la homogeneización, el cual debe ser de 2 para mantener la forma reducida del glutatión y además favorecer la precipitación de las proteínas. El uso de ácidos como el perclórico, tricloroacético o metafosfórico ocasiona que varíe la relación GSH:GSSG en la muestra. Por otra parte, es importante asegurarse de que no quede nada de γ -glutamyl transferasa en la muestra, ya que esta enzima metaboliza la destrucción de GSH.

Finalmente, se debe considerar la estabilidad de la muestra. En la mayoría de los tejidos y fluidos fisiológicos el contenido aparente de glutatión, así como la relación GSH:GSSG cambia rápidamente *post-mortem* o post-recolección. La estabilidad del glutatión total en los sobrenadantes acidificados libres de proteína a 0° C o a -20°C es baja (pérdida del 5 al 20% en 24 h) y buena de -78°C a -190°C (pérdida de 0 a 5% aún en largos periodos de almacenamiento).⁴

Este tipo de problemas en la manipulación de la muestra ha planteado nuevos retos enfocados a crear metodologías que reduzcan el tratamiento previo de la muestra y lograr obtener resultados más reales y confiables.

2.6 Biosensores Electroquímicos

La habilidad de los electrodos ion-selectivos (ISEs) para hacer determinaciones directas o indirectas en muestras complejas sin preocuparse por el color o la turbidez de la matriz. El hecho de que tales determinaciones requieran equipo relativamente barato hace que resulten técnicas atractivas para los científicos.

Los ISEs son considerados sensores químicos, dispositivos analíticos pequeños y relativamente sencillos comparados con los tradicionales equipos analíticos. La complejidad del diseño de un dispositivo analítico está íntimamente relacionado con el tratamiento previo a la medición de la muestra (etapas de separación de interferentes en la medición) para lograr una medición libre de interferencias. Los sensores químicos incluyen un mecanismo de detección selectivo hacia el analito en cuestión, lo cual simplifica en gran medida el tratamiento previo de la muestra y en algunos casos lo elimina por completo. Esencialmente, los sensores químicos son transductores químicos ya que convierten la información química en señales eléctricas,⁷⁰ por ejemplo, los transductores electroquímicos (amperométricos y potenciométricos). Existen además transductores ópticos (espectrofotométricos, elipsométricos) y otros tipos de transductores.⁷¹⁻⁷³ De acuerdo a lo descrito anteriormente, se considera a los ISEs como sensores químicos basados en la transducción con diferentes arreglos electrónicos. Tales sensores consisten en membranas que contienen iones, los cuales generan un potencial cuando se ponen en contacto con la solución. El potencial en cuestión es función de la actividad de los iones en solución para los cuales la membrana es selectiva.⁷⁴ De esta manera, los transductores se basan en un mecanismo de reconocimiento iónico que genera determinada señal.

Los sensores pueden ser adaptados para determinar moléculas en lugar de iones modificando la membrana o capa selectiva con algún compuesto selectivo a la molécula en estudio. Si la membrana o capa se modifican con alguna sustancia bioactiva (enzimas, sistemas multienzimáticos, anticuerpos, componentes de membranas celulares, microorganismos o biomoléculas en general) que sea capaz de reconocer específicamente las sustancias de interés en contacto íntimo con un apropiado sistema transductor el

resultado es un BIOSENSOR,⁷⁵ es decir, un biosensor es un sensor hecho con elementos biológicos diseñado para determinar diferentes analitos selectivamente. De esta manera, un biosensor consta de un elemento rígido correspondiente a la parte del transductor y un elemento blando correspondiente a la parte bioactiva.

El desarrollo que han alcanzado los biosensores se debe en gran parte a las ventajas que presentan sobre otros sistemas de análisis, algunas de ellas son:

- Las determinaciones son mucho más sencillas ya que debido a su alta selectividad eliminan prácticamente los tratamientos previos a la muestra.
- Generalmente su costo es bajo.
- Se automatizan fácilmente.
- Debido a su sencillez, pueden incluirse en equipos portátiles utilizados en mediciones de campo cuando la muestra no puede ser almacenada o transportada.
- Son tan precisos, exactos y sensibles como, por ejemplo, los métodos espectrofotométricos.
- Poseen un carácter no destructivo, lo que permite realizar multianálisis con una sola muestra.
- Son aplicables en amplios intervalos de concentración (10^{-3} - 10^{-6} M).
- En la industria química han resultado ser muy útiles en el monitoreo *in situ* de procesos químicos.
- El tiempo real de análisis es relativamente corto, lo cual es muy importante en análisis de analitos corporales.

De acuerdo a las ventajas enumeradas, el principal campo de los biosensores se encuentra en el área clínica y de la salud; sin embargo, se han logrado adaptar a varios procesos industriales con gran éxito.⁷⁵

2.6.1 Clases de Biosensores Electroquímicos.

Todos los sensores electroquímicos caen dentro de las categorías de potenciométricos o amperométricos.⁷⁶

2.6.1.1 Sensores Potenciométricos.

En este tipo de sensores la membrana o superficie sensitiva actúa como una batería generando un potencial proporcional a la concentración (actividad) del analito. Este potencial determinado es relativo a un electrodo inerte de referencia en contacto también con la solución. A causa de que la mayoría de las membranas son conductores pobres las determinaciones potenciométricas son hechas bajo condiciones de intensidad de corriente nula, ya que la intensidad de corriente ocasiona que la batería se descargue perturbando el equilibrio en la interfase membrana-muestra. Algunos de los sensores potenciométricos más conocidos son el de pH, Na^+ y K^+ .

La figura 2.3 muestra el mecanismo de un sensor potenciométrico. Si se establece una separación de cargas entre los iones en la interfase se genera una diferencia de potencial a través de la interfase. El problema radica en encontrar una membrana que atraiga selectivamente un tipo de carga de la fase de la solución hacia la fase de la membrana.

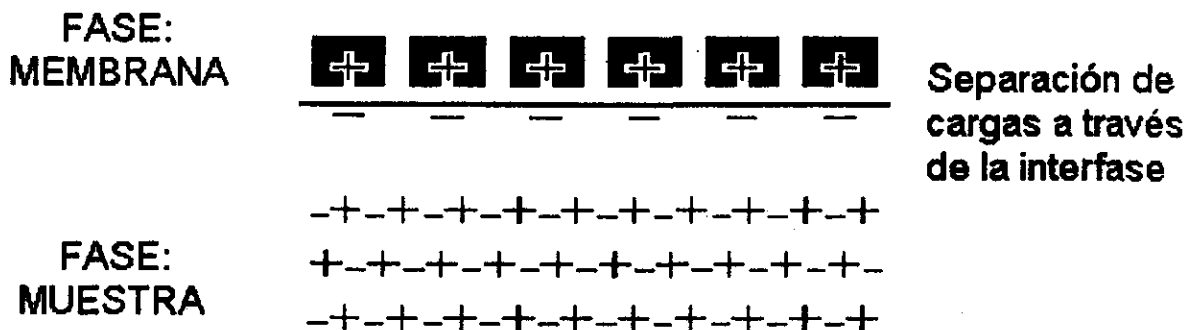


Figura 2.3. La membrana ISE extrae iones de la solución. La separación de cargas resultante que se establece a través de la interfase muestra-membrana genera un potencial proporcional a la concentración (actividad) de los iones presentes en la muestra.

Este tipo de sensores puede ser utilizado en determinaciones directas e indirectas con sus ventajas y desventajas.

Las principales ventajas son que en ensayos directos el sensor se puede poner en contacto con muestras de sangre, plasma o suero. Son muy apropiados en mediciones que requieran rapidez a causa de posibles efectos del tiempo en las muestras problema. Esto hace que sean ampliamente utilizados en aplicaciones de laboratorios clínicos. Por otra parte, una de sus principales características es que las muestras pueden ser analizadas con sistemas automatizados.

Una desventaja es que las mediciones en muestras diluidas presentan problemas en la sensibilidad de la medición. La principal desventaja es el contenido de sólidos presentes en la muestra no tratada que llega a afectar los análisis dando resultados erróneos.

2.6.1.2 Sensores Amperométricos.

En el caso de los sensores amperométricos el voltaje es aplicado entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Esta imposición de potencial hace que se lleve a cabo una reacción redox provocando un flujo de corriente proporcional a la concentración del analito. Tal es el caso del sensor polarográfico para determinar oxígeno.

2.7 Técnicas Electroquímicas.

2.7.1 Generalidades.

Cuando se pone en contacto un conductor metálico M^0 con una disolución de una especie M^{n+} de concentración C_0 se establece un equilibrio que se caracteriza por un potencial de equilibrio y una corriente nula de electrólisis.

Si se impone un potencial diferente al potencial de equilibrio el sistema se perturba, rompiéndose la condición de equilibrio. En consecuencia, el sistema responde para establecer un nuevo estado de equilibrio mediante un proceso redox de la especie M^0 o M^{n+} . El proceso consiste en el intercambio de electrones en la superficie del electrodo siempre y cuando el potencial sea adecuado. Por otra parte, se genera un

régimen de transporte de cargas y un gradiente de concentración del seno de la disolución a la superficie del electrodo si la especie que se consume es M^{n+} . Durante este proceso se genera una corriente de electrólisis en función del potencial impuesto al electrodo, la cual depende del transporte de la especie electroactiva hacia el electrodo, del intercambio de electrones en la superficie del electrodo, de las reacciones químicas en disolución de la especie que se electroliza o de las especies que se generan al electrodo y de los posibles equilibrios de adsorción en la superficie del electrodo de las especies en cuestión.

La cinética de intercambio de electrones involucra fenómenos fisicoquímicos en la interfase entre el electrodo y el seno de la disolución y depende de la naturaleza de la superficie del electrodo y de las características de la especie electroactiva, así como de su estado de solvatación.

El transporte de materia, por otra parte, depende de las condiciones experimentales seleccionadas. Básicamente existen tres formas de transporte de materia al electrodo controlables experimentalmente:

a) *Transporte por migración.* Es el movimiento de una partícula cargada debido a su interacción con un campo eléctrico como el que se forma en la vecindad del electrodo. Este tipo de transporte puede ser controlado si se lleva a un mínimo la fracción de la corriente de migración aportada por la especie electroactiva a la corriente de migración total. Esto se logra por medio de electrolitos inertes o soportes presentes en el medio de reacción, los cuales disminuyen la fuerza del campo cerca del electrodo.

b) *Transporte por convección.* Es el transporte de masa causado por el movimiento de la solución debido a la agitación externa. Existen dos formas de controlar este tipo de transporte: i) si se emplean electrodos fijos y se mantienen la disolución sin agitar se logra obtener una convección prácticamente nula; ii) si se impone un régimen hidrodinámico mediante la agitación controlada de la disolución. Esto se logra obtener con una excelente precisión con el uso de electrodos giratorios.

c) *Transporte por difusión.* Este tipo de transporte se caracteriza por la capacidad de la especie a difundir, lo cual depende de su naturaleza química (tamaño y carga) y de las propiedades del disolvente que solvata a la especie. Por otra parte, la corriente de difusión depende del gradiente de concentración generado por la electrólisis, el cual a su vez depende del potencial impuesto y el régimen convectivo empleado.

Si se mantiene constante el transporte por migración y por convección las leyes de Fick⁷⁷ permiten establecer las relaciones teóricas necesarias para caracterizar la corriente electrolítica y la concentración de las especies del sistema en cuestión.

Por otra parte, de acuerdo a la forma de transporte de materia se pueden clasificar dos grupos de metodologías electroanalíticas.⁷⁷

a) *Métodos basados en régimen de difusión convectiva.* En este tipo de métodos la velocidad de consumo de la especie electroactiva al electrodo es igual a la velocidad de difusión al electrodo. A partir del uso de microelectrodos se puede mantener constante el gradiente de concentración establecido.

b) *Métodos basados en régimen de difusión pura.* En éste tipo de métodos el estado de transición cambia rápidamente, por lo que existe una necesidad de cambiar de perturbación al sistema para definir un nuevo estado de transición y con esto garantizar el flujo de corriente por electrólisis, la cual refleja los fenómenos de difusión de las especies.⁷⁸

La elección del método evidentemente dependerá de la información que se requiera; de esta manera, se tiene dentro de los métodos de régimen de difusión convectiva la voltamperometría con electrodos giratorios y la voltamperometría con el electrodo giratorio de disco y anillo. La voltamperometría lineal y la cíclica con electrodos fijos, la cronopotenciometría y la cronoamperometría, son métodos de régimen de difusión pura. Mientras que la polarografía se considera un método en condiciones de estado estacionario o pseudo convectivo.

Como se mencionó anteriormente, el empleo de uno u otro régimen depende de la información electroquímica que se desea obtener o que se necesita para definir un sistema. Los diferentes métodos electroquímicos son complementarios y no se excluyen entre sí, por lo que la combinación adecuada de estos prácticamente puede caracterizar prácticamente cualquier sistema químico.

2.7.2 Voltamperometría Cíclica.

La voltamperometría cíclica (VC) probablemente sea la técnica electroanalítica más versátil utilizada en el estudio de especies electroactivas. Debido a esta versatilidad y a la sencillez con la que se realizan las mediciones se ha convertido en una herramienta muy útil en diversas áreas de la química, como la inorgánica,⁷⁹ la orgánica⁸⁰ y la bioquímica.⁸¹ A menudo, este es el primer experimento que se realiza en estudios electroanalíticos de compuestos, material biológico o de la superficie de algún electrodo. El éxito de la VC radica en su capacidad para mostrar el comportamiento redox de cierto sistema en un amplio intervalo de potencial. Los resultados de sondeo generados a partir de esta técnica son análogos a los obtenidos por técnicas convencionales de espectrofotometría.

2.7.2.1 Fundamentos de la Voltamperometría Cíclica.

En la voltamperometría cíclica el potencial aplicado al electrodo de trabajo, inmerso en la disolución a régimen de difusión pura, se barre linealmente con el tiempo (velocidad constante) desde el potencial de equilibrio E_0 hasta un potencial predeterminado, E_1 , llamado potencial de inversión, a partir del cual la dirección del barrido de potencial se invierte (figura 2.4). En cualquier momento el barrido se puede detener o permitir que el ciclo del instrumento entre E_1 y algún otro valor de potencial preseleccionado E_2 termine. La corriente generada en este proceso se registra como función del potencial de barrido aplicado. Es común que existan ligeras diferencias entre el primer ciclo y los sucesivos barridos. Estos cambios que aparecen en ciclos repetitivos

son importantes claves para elucidar información contundente acerca de mecanismos de reacción.

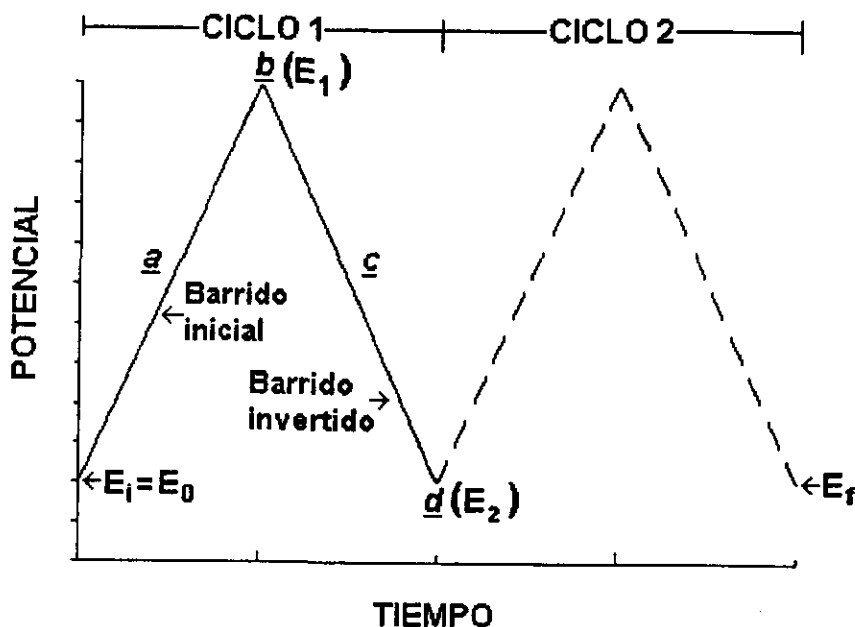


Figura 2.4. Programa de perturbación en voltamperometría cíclica.

A consecuencia de que el régimen de difusión es puro la corriente registrada refleja los fenómenos de transferencia de carga y las especies que se generan o consumen en el electrodo.

Un típico voltamperograma cíclico es el que se obtiene con un electrodo de platino sumergido en una solución 0.6 mM de $K_3Fe(CN)_6$ como especie electroactiva en 0.1 M de KNO_3 como electrolito soporte (figura. 2.5)

En general, estas curvas se caracterizan por un potencial de pico anódico (E_{pa}) y uno catódico (E_{pc}); por una corriente de pico anódica (i_{pa}) y una catódica (i_{pc}) para un sistema redox determinado.

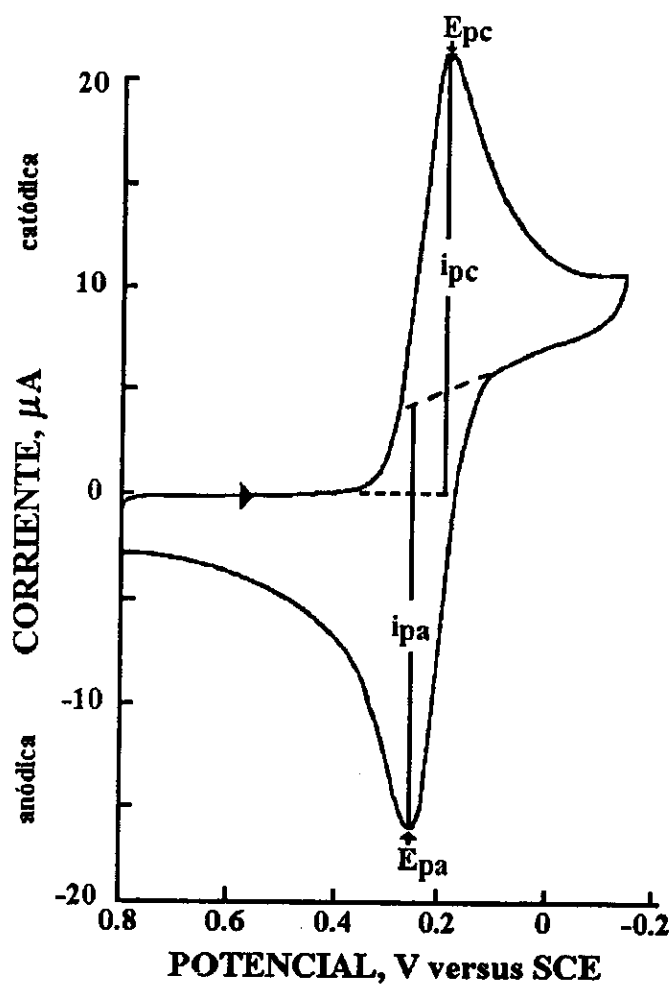


Figura 2.5 Voltamperograma de una solución 0.6 mM de $K_3Fe(CN)_6$ como especie electroactiva en 0.1 M de KNO_3 como electrolito soporte. Por convención $i_c > 0$, $i_a < 0$.

El estudio de estos parámetros permite determinar las propiedades cinéticas de los sistemas y las reacciones químicas acopladas al intercambio de electrones.

Es ahora conocido que la corriente de pico de los sistemas controlados por la difusión es una función lineal de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial.⁷⁷ Esta relación viene dada por la ecuación de Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.69 * 10^5 n^{\frac{3}{2}} A D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C^*$$

donde:

- i_p = Corriente de pico [amperios].
 n = Número de electrones intercambiados.
 A = Superficie del electrodo [cm²].
 D_0 = Coeficiente de difusión [cm²s⁻¹].
 v = Velocidad de barrido de potencial [Vs⁻¹].
 C^* = Concentración de la especie electroactiva [mol·cm⁻³].

La altura del pico de corriente puede ser utilizada para determinar la concentración de algún reactivo en el seno de la disolución. Sin embargo, otros métodos electroquímicos tales como la voltamperometría diferencial de pulsos resultan ser mucho mejores para estos fines. La aplicación real de la VC es el análisis de reacciones químicas homogéneas acopladas a procesos electroquímicos. El diagnóstico de reacciones químicas acopladas se basa con frecuencia en las alturas relativas de los picos anódicos y catódicos y los valores de potencial (E_p).

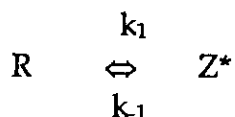
Por otra parte, al variar la velocidad de barrido se puede determinar la naturaleza de las reacciones electroquímicas. Con base en series de experimentos que consisten en el análisis de la relación entre la corriente y los potenciales de pico con la variación de la velocidad de barrido. I. Shain y R. Nicholson⁸² establecieron criterios cinéticos sobre las reacciones electroquímicas que pueden involucrar diferentes tipos de reacciones químicas acopladas. La figura 2.6 muestra las tendencias para diferentes tipos de mecanismos.

Mecanismos Electroquímicos que Involucran Reacciones Químicas Acopladas:

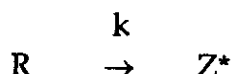
I. Reacción electroquímica reversible (Er):



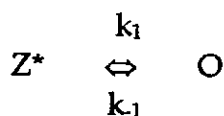
- II. Reacción electroquímica reversible seguida de una reacción química reversible (ErCr):



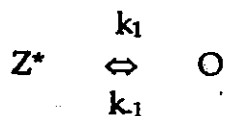
- III. Reacción electroquímica reversible seguida de una reacción química irreversible (ErCi):



- IV. Reacción electroquímica reversible precedida por una reacción química reversible (CrEr):

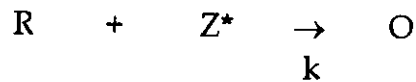


- V. Reacción electroquímica irreversible precedida por una reacción química irreversible (CiEi):

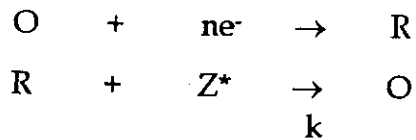


- VI. Reacción electroquímica reversible seguida de una reacción química irreversible en un mecanismo catalítico (ErCi'):

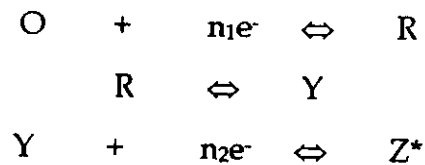




VII. Reacción electroquímica irreversible seguida de una reacción química irreversible (ErCi):



VIII. Reacción electroquímica múltiple con presencia de una reacción química (ECE):



*En todas las situaciones la especie Z no es electroactiva.

En estos casos, la constante heterogénea de transferencia de carga puede relacionarse con la diferencia de potenciales de pico, la velocidad de barrido y el coeficiente de difusión; lo cual permite el estudio a fondo de los diferentes tipos de reacciones. En 1965 Nicholson estableció la siguiente relación:

$$k^0 = \psi (\pi n F v D_0 / RT)^{\frac{1}{2}}$$

donde ψ es una función dependiente de E_p .⁷⁷

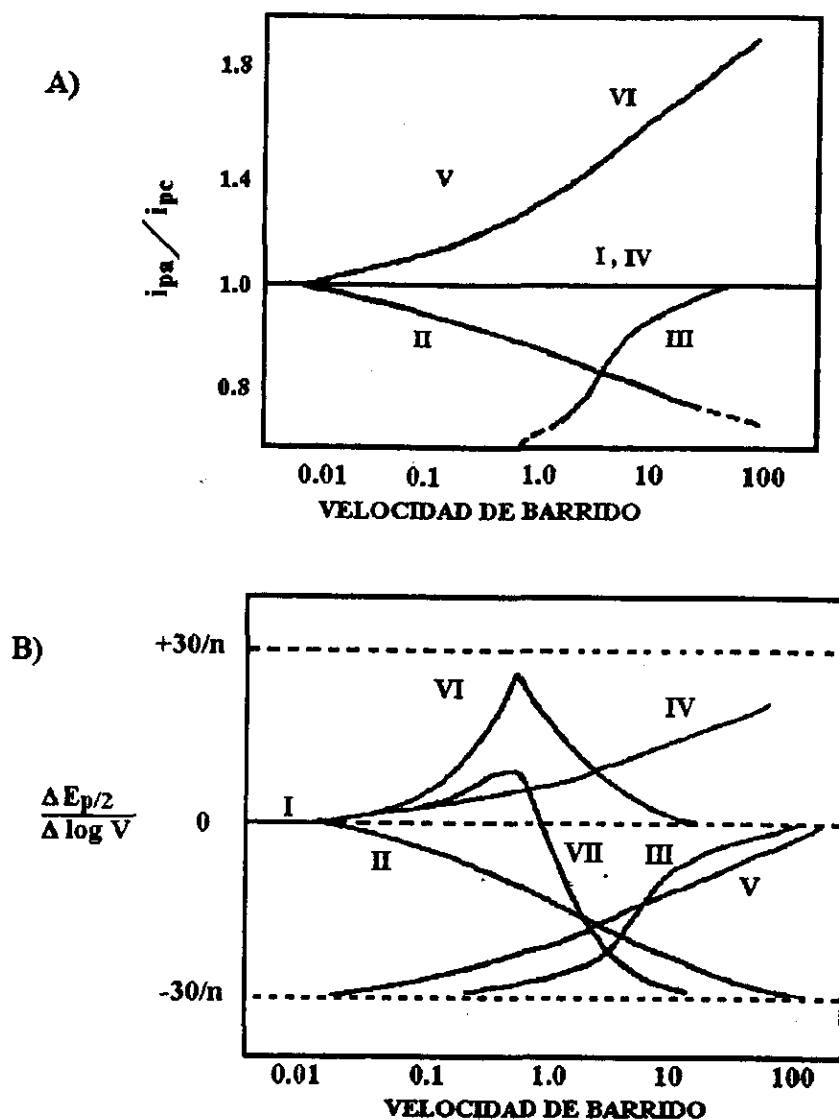


Figura 2.6. A) Relación i_{pa}/i_{pc} en función del logaritmo de la velocidad de barrido para diferentes mecanismos electroquímicos. B) Velocidad de desplazamiento de potencial en función del logaritmo de la velocidad de barrido para diferentes mecanismos al electrodo.⁸²

2.7.3 Cronoamperometría.

La cronoamperometría es una técnica analítica de potencial o corriente controlados, la cual se basa en una función de excitación de potencial y se aplica a un electrodo sumergido en una disolución inmóvil.

El aspecto más importante en este método electroquímico es la oxidación o reducción de alguna especie electroactiva con control de la difusión.

En la figura 2.7 se considera que un electrodo plano se sumerge en una disolución inmóvil, la cual contiene O como única especie electroactiva, el eje vertical representa la concentración de la solución; mientras que, el horizontal la distancia electrodo-disolución. Esta interfase se representa por la línea vertical. La línea discontinua representa la concentración inicial de O , la cual es homogénea en toda la disolución; la concentración inicial de R es cero. La función de excitación que se transmite en la interfase electrodo-disolución consiste en una serie de etapas de potencial desde un valor inicial E_i , en el cual no existe corriente asociada a algún proceso redox hasta un segundo potencial E_x , (figura 2.8). El valor del segundo potencial es aquel en el que esencialmente todo O en la superficie del electrodo se reduce instantáneamente a R de acuerdo a:



La desaparición electroquímica de O en la disolución que se encuentra inmediatamente adyacente a la superficie del electrodo promueve una difusión neta de O del seno de la disolución hacia la superficie del electrodo. Sin embargo, tan rápido como O difunde hacia el electrodo, es convertido a R . De esta manera, la velocidad de conversión de O y la consecuente formación de R esta controlada solo por la velocidad de difusión del O hacia la superficie del electrodo, bajo la influencia de un gradiente de concentración. La figura 2.7B representa gráficamente la conversión de O y la acumulación de R como función del tiempo. Como se puede observar, el transporte neto de masa siempre ocurre desde una región de alta concentración a una de baja concentración. Los perfiles mostrados en la figura corresponden al caso en el que los coeficientes de difusión de O y R son iguales. También se asume que hay suficiente electrolito soporte para eliminar la migración.

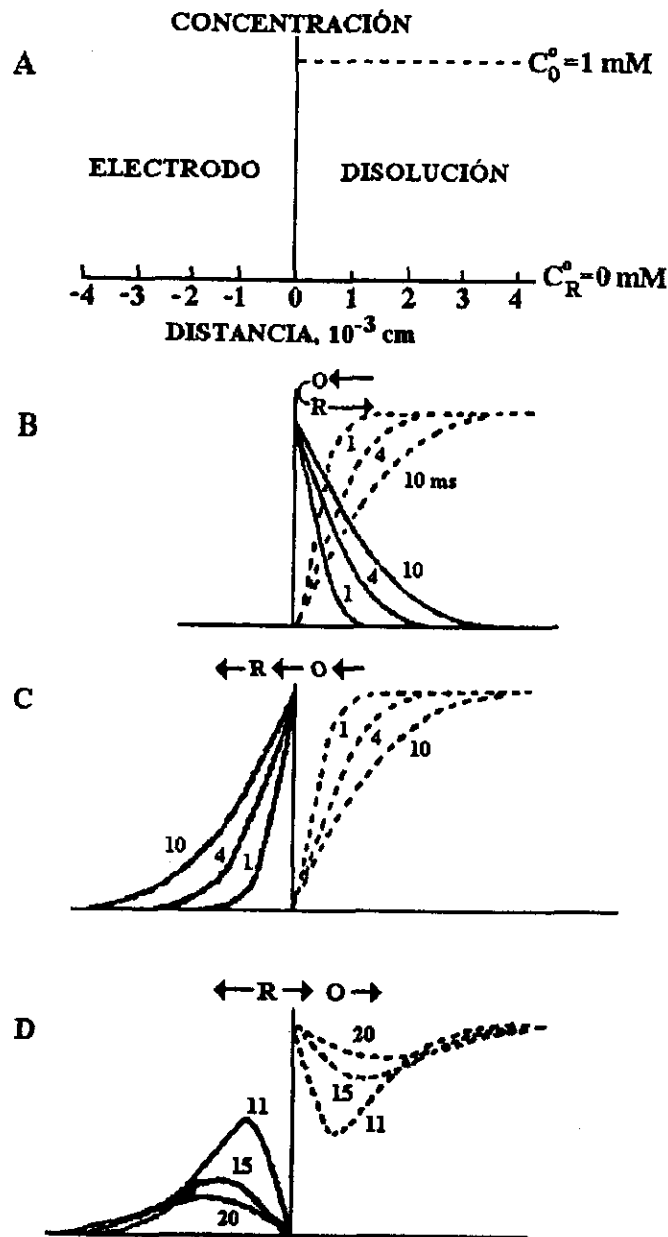


Figura 2.7. Perfil de concentración-distancia durante el proceso de reducción de la especie O a la especie R , en un sistema de difusión controlada. $D_O = D_R$. (A) Condiciones iniciales $C_O^0=1$ $C_R^0=0$ mM. (B) Perfil para O (línea discontinua), y R (línea continua) para 1, 4, y 10 ms después de la etapa de potencial E_x . R es soluble en solución. (C) Perfil para O y R en 1, 4, y 10 ms después de la etapa de potencial E_x . R es soluble en el electrodo. (D) Paso de potencial de E_x a E_f para $\tau=10$ ms, donde la oxidación de R a O es ahora un proceso de difusión controlada. Los perfiles son para 11, 15, y 20 ms después de la etapa E_x . R es soluble en el electrodo.⁸³

La figura 2.7C ilustra el fenómeno cuando la especie R es más soluble en el material del electrodo de trabajo que en la solución. Tal es el caso de la reducción de ciertos iones metálicos (por ejemplo: Pb^{2+} , Cd^{2+}) a átomos neutros con el uso de electrodos de mercurio. El área bajo un particular perfil de R es proporcional a la cantidad de R generada en un tiempo determinado. Mientras que el área arriba de algún perfil de O convertido, es proporcional a la cantidad de O consumido por electrólisis.

El tiempo de duración de la etapa de potencial (intervalo de tiempo τ de E_x), se establece usualmente por el tipo de información deseada para un sistema en particular.

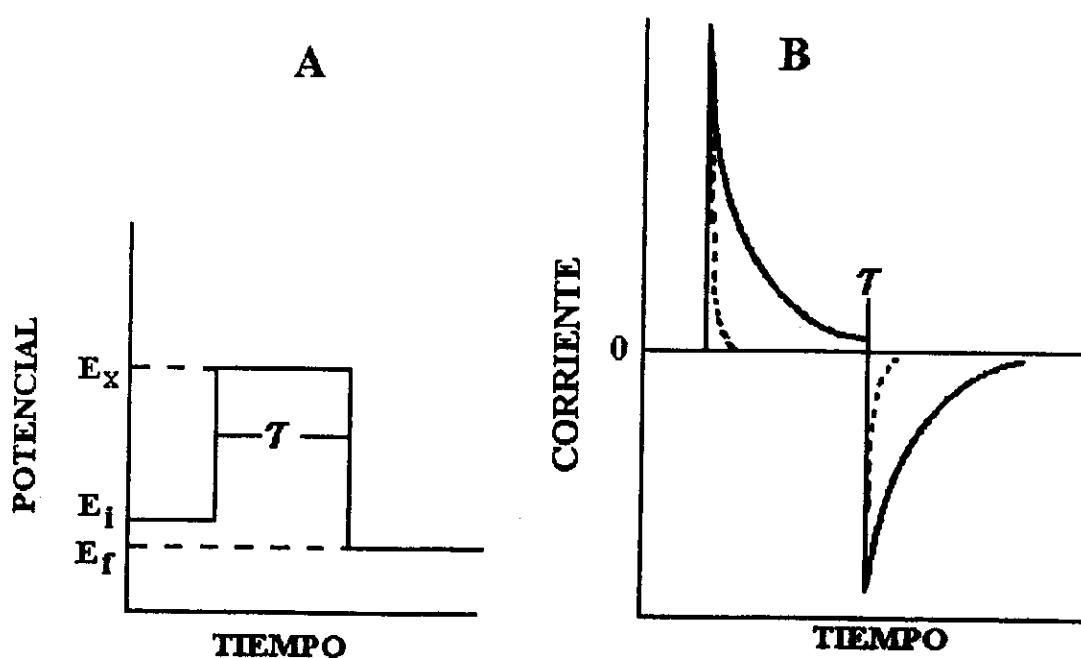


Figura 2.8. (A) Programa de perturbación de potencial. E_i : Etapa de potencial inicial. E_x : Etapa de potencial determinada. E_f : Etapa de potencial final. τ : tiempo de duración de la etapa de potencial E_x . (B) Programa de perturbación de doble pulso. Respuesta, corriente en función del tiempo (cronoamperograma).

La etapa de potencial E_x generalmente se detiene cambiando el potencial a un valor final E_f en el cual ahora R es oxidado a O (figura 2.8A). Si este potencial es lo suficientemente positivo la concentración de R en el electrodo prácticamente es cero. Consecuentemente, el R acumulado ahora difunde hacia el electrodo, donde es

consumido por el proceso de oxidación, generando las especies originales en la solución. Este proceso se ilustra en la figura 2.7D.

La relación de concentración de O y R en la superficie del electrodo está relacionada al potencial impuesto mediante la ecuación de Nernst para un sistema reversible:

$$E = E^{\circ} - \frac{0.059}{n} \log \frac{C_R^s}{C_O^s}$$

donde:

C_R^s = Concentración del reductor en disolución.

C_O^s = Concentración del oxidante en disolución.

Para lograr la conversión de O a R mediante un proceso controlado por difusión es necesario que el potencial impuesto a la interfase electrodo-disolución logre que la relación C_R^s/C_O^s sea grande. Para cuestiones prácticas $C_R^s/C_O^s=1000$ equivale a reducir a cero la concentración de O en la superficie del electrodo. Por el contrario, para C_R^s/C_O^s pequeños se promueve la oxidación de R en un proceso de difusión controlado.

En cronoamperometría la señal de excitación es una onda cuadrada de voltaje (figura 2.8A) con etapas de potencial aplicadas al electrodo de trabajo desde un valor en el cual no hay corriente faradaica, E_i ; hasta un segundo potencial, E_x , en el cual la concentración en la superficie del electrodo de las especies electroactivas es prácticamente cero. El potencial se puede mantener en la etapa E_x hasta el final del experimento o ser detenido en un potencial final E_f después de que ha pasado algún intervalo de tiempo τ . Este último experimento es conocido como cronoamperometría de doble pulso.

La corriente como función del tiempo es la respuesta en cronoamperometría. En la figura 2.8B se presenta un cronoamperograma de doble pulso típico (línea continua). La línea discontinua muestra la respuesta a la señal de excitación para una solución que contienen solamente electrolito soporte. Esta corriente decae rápidamente cuando al electrodo se le aplica un potencial. La etapa de potencial inicia con una corriente instantánea como resultado de la reducción de O a R . La corriente cae posteriormente a

medida que la electrólisis procede. Es importante recordar que la carga Q que pasa a través de la interfase está relacionada con la cantidad de materia que ha sido convertida (ley de Faraday) y la corriente i se relaciona con la velocidad instantánea en la cual esta conversión ocurre. Tomando en consideración lo anterior y de acuerdo a la ley de Fick se tiene que:

$$i = nFAD_0 \left(\frac{\partial C_0}{\partial x} \right)_{x=0,t}$$

donde:

i_t = corriente al tiempo t [A]

n = número de electrones [eqmol⁻¹]

F = constante de Faraday, 96,485 [Ceq⁻¹]

A = área del electrodo [cm²]

D_0 = coeficiente de difusión de O [cm²s⁻¹]

C_0 = concentración de O [molcm⁻³]

x = distancia del electrodo [cm]

t = tiempo [s]

Si se examina el perfil de la figura 2.8B para el caso O cuando $x=0$ se observará que la pendiente decrece con el tiempo, lo cual significa que decrece la corriente.

La corriente decae suavemente desde un valor inicial cuando $t = 0$ hasta un valor aproximado de cero a medida que pasa el tiempo, como lo describe la ecuación de Cottrell para un electrodo plano:

$$i_t = \frac{nFAC_0D_0^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = Kt^{-1/2}$$

En ella puede observarse claramente que la corriente es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo. La ecuación de Cottrell establece que el producto $it^{1/2}$ debe ser constante para una reacción controlada por la difusión para un electrodo plano. Las posibles desviaciones a este hecho pueden ser causadas por varias situaciones incluyendo la difusión no planar, la convección en la celda, la carga lenta del

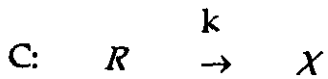
electrodo durante la etapa de imposición de potencial y las reacciones químicas acopladas. Para cada una de estas situaciones, la representación gráfica de $it^{1/2}$ contra t presenta un perfil característico. Por ejemplo, las desviaciones positivas de $it^{1/2}$ a medida que se incrementa el tiempo pueden ser evidencia de la existencia de convección dentro de la celda electroquímica. Esta convección puede ser causada por vibraciones externas o gradientes de concentración generados por diferencias locales de concentración que resultan de las perturbaciones electroquímicas. Mientras que, la influencia de las vibraciones externas puede ser eliminada por ajustes en la celda, la convección natural debida a la diferencia de densidades de O y R es una consecuencia inevitable del experimento.

Para evitar posibles fuentes de error lo aconsejable es el uso previo de algún sistema redox reversible libre de reacciones químicas acopladas y adsorción. Las deficiencias en el diseño de la celda o los componentes electrónicos del equipo podrán ser reveladas antes de proceder a realizar los experimentos determinantes. Ejemplos típicos de sistemas reversibles son la reducción del Tl^+ en un electrodo de mercurio y el sistema ferri/ferrocianuro en 1-3 M de KCl con electrodos sólidos.⁸³

La cronoamperometría es una herramienta ampliamente utilizada para determinar los coeficientes de difusión de las especies electroactivas. A pesar de que el área del electrodo puede ser medida físicamente una práctica común es medirla electroquímicamente, a partir de un sistema con coeficientes de difusión conocidos,⁸⁵ esto resulta útil cuando la geometría del electrodo complica la medición de su área. En reacciones electroquímicas heterogéneas la cronoamperometría ha sido utilizada para determinar las constantes de velocidad heterogéneas.⁷⁷

El comportamiento de $it^{1/2}$ en función del tiempo puede verse sustancialmente influenciado por la presencia de reacciones químicas acopladas. Consecuentemente, las variaciones características de $it^{1/2}$ versus t han sido empleadas en el estudio de reacciones químicas acopladas a los procesos electroquímicos.

Un ejemplo de esta aplicación es el estudio del mecanismo ECE en el cual existe una etapa química entre dos etapas electroquímicas:



En general, la cronoamperometría ha sido utilizada en el estudio de diversos mecanismos relacionados con la superficie de electrodos.⁸⁵ Sin embargo, siempre es conveniente obtener información de diferentes fuentes independientes para conocer a fondo un mecanismo determinado.

La cronoamperometría de doble pulso es particularmente útil en el estudio de sistemas que siguen mecanismos EC⁸⁴ o procesos de dimerización.⁸⁵

2.7.4 Potenciometría

Una de las principales áreas de la electroquímica es la encargada de la medición de la concentración de las especies químicas. Dentro de los experimentos clásicos se encuentra la potenciometría cuyo objetivo es la obtención de información acerca de la composición de una solución mediante el potencial que aparece entre dos electrodos. La medición del potencial de la celda se determina bajo condiciones reversibles en forma termodinámica; esto implica que se debe dejar la celda el tiempo suficiente para que alcance el equilibrio y de ésta manera tener una corriente insignificante en el transcurso de la determinación. En este tipo de mediciones el dispositivo de control se destina principalmente a asegurar que no exista ninguna cantidad significativa de corriente en la celda. El voltaje puede ser medido mediante un potenciómetro, un instrumento que utiliza un voltaje igual y opuesto para compensar el voltaje de la celda; o por medio de un seguidor de voltaje, que reproduce simplemente el voltaje de la celda por medios electrónicos.

Para obtener mediciones analíticas reales uno de los electrodos deberá tener un potencial constante y no sufrir alteraciones entre uno y otro experimento. El electrodo que cumple esta condición se conoce como electrodo de referencia. Debido a la constancia de potencial del electrodo de referencia cualquier cambio en el potencial de la celda se deberá a la contribución del otro electrodo, llamado electrodo indicador o de trabajo.

El potencial de una celda se expresa con la siguiente relación:

$$E = (E_{\text{ind}} - E_{\text{ref}}) + E_{\text{unión}}$$

El potencial del electrodo indicador (E_{ind}) es sensible a las condiciones químicas de la disolución; mientras que, el electrodo de referencia (E_{ref}) tiene un potencial fijo que es independiente de la disolución. El potencial de unión líquida ($E_{\text{unión}}$) se presenta en la interfase entre el electrolito dentro del compartimiento del electrodo de referencia y la solución externa. Siempre que dos fases se ponen en contacto aparece un potencial de unión; si las dos fases son disoluciones electrolíticas de diferente composición, el potencial se conoce como potencial de unión líquida. Cuando una de las dos disoluciones contiene un electrolito concentrado el potencial de unión líquida es pequeño, por lo que el potencial medido prácticamente solo depende de la diferencia de potencial entre el electrodo indicador y el potencial de referencia.

2.7.4.1 Electrodo indicador.

El potencial de un electrodo indicador obedece la ecuación de Nernst:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln (\gamma_O/\gamma_R) + \frac{RT}{nF} \ln (C_O/C_R)$$

Donde:

E° = potencial normal de un par redox referido al Electrodo Normal de Hidrógeno (ENH), con las actividades de las especies iguales a la unidad.

γ_O = Coeficiente de actividad de la especie O

γ_R = Coeficiente de actividad de la especie R

Con fines prácticos, resulta más conveniente combinar la contribución de los coeficientes de actividad con E^0 en una nueva magnitud llamada potencial formal, E° , de manera que la ecuación anterior se puede reescribir como:

$$E = E^{\circ} + RT/nF \ln(C_O/C_R)$$

Con la aclaración de que E° esta en función de la composición de la disolución, incluyendo la formación de complejos.

2.7.4.2 Clasificación de los electrodos.

Existen diversas clasificaciones de electrodos, pero en general se pueden clasificar de acuerdo a los procesos que son responsables del potencial.

- Electrodos clase I. Son aquellos en donde se tiene un metal en equilibrio con una disolución de sus iones. Un ejemplo es una lámina de cobre que está en contacto con una solución de iones cúpricos.
- Electrodos clase II. Consisten en un metal en equilibrio con una sal poco soluble del mismo elemento, ejemplos de éstos son los electrodos de referencia de calomelanos y Ag/AgCl.
- Electrodos selectivos. En esta clasificación entran los electrodos de membrana como el electrodo de vidrio, los electrodos selectivos a iones (electrodos ion selectivos) y los electrodos sensibles a efectos de campo y que poseen iones selectivos utilizados como sensores químicos.

2.7.4.3 Electrodos de ion selectivo.

La característica principal de este tipo de electrodos es que muestran un potencial proporcional al logaritmo de la actividad de algún ion en específico. Se pueden clasificar en cuanto su modo de operación, en primarios, aquellos que responden directamente a la especie de interés y en sensibilizados, aquellos que responden a algunas otras especies no necesariamente iónicas, mediante la incorporación de un sensibilizador, como por ejemplo, una enzima.^{86,87}

El potencial de respuesta, E , de un electrodo ion selectivo esta dado por una ecuación de Nernst modificada,⁸⁸ que tiene en cuenta que además de la especie principal A de carga z_a existen otros iones, B , C , etc. que contribuyen al potencial:

$$E = (\text{Constante}) + \frac{0.0592}{z_a} \log \left[a_a + k_{pot}^{A,B} * (a_b)^{z_a/z_b} + k_{pot}^{A,C} * (a_c)^{z_a/z_c} + \dots \right]$$

Donde:

A, B, C = especies en estudio.

$k_{pot}^{A,B}$ = coeficiente de selectividad potenciométrico de la especie A sobre la especie B .

$k_{pot}^{A,C}$ = coeficiente de selectividad potenciométrico de la especie A sobre la especie C .

z_a, z_b, z_c = cargas de las especies A, B, C respectivamente.

a_a, a_b, a_c = actividad de la especies A, B, C respectivamente.

Los coeficientes de selectividad representan los efectos relativos de los diversos iones sobre el potencial. La determinación de cual es el ion primario es arbitraria, por ejemplo, si A es el ion con el cual la respuesta de potencial es mayor, entonces será el ion primario, mientras que los demás serán iones interferentes. Por lo general, los coeficientes son números pequeños, lo cual indica que la interferencia de determinado ion es pequeña. Un valor grande del coeficiente de selectividad indica que las especies correspondientes interfieren con la medición del ion primario, por lo que deberán estar ausentes. Finalmente, el coeficiente de selectividad no es una constante sino que depende de la concentración de la especie que interfiere.⁸⁹

3. OBJETIVOS

- 1.0 Establecer las condiciones experimentales necesarias para la formación del TLME (electrodo de capa de mercurio), utilizando voltamperometría cíclica y cronoamperometría
- 2.0 Caracterización del sistema GSH/GSSG y de la capa del complejo glutatión-mercurio imponiendo un programa de perturbación de barrido triangular de potencial cíclico.
- 3.0 Establecer las condiciones experimentales para obtener la capa del complejo glutatión-mercurio utilizando cronoamperometría de doble pulso.
- 4.0 Obtener las relaciones de Nikolsky, $[E]_{i=0}=f(\log C)$, con el electrodo de capa del complejo glutatión-mercurio para GSH y GSSG.
- 5.0 Determinar el coeficiente de selectividad para el sistema GSH/GSSG con el electrodo de capa del complejo glutatión-mercurio.

4. SECCION EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos.

Glutación (Aldrich). Pureza 98 %

Hidróxido de sodio, lentejas (Aldrich).

Ácido nítrico (Merck). Concentración 65 %.

Nitrato de potasio (Mallinckrodt).

Mercurio metálico

Biftalato de potasio (Aldrich).

Tris-hidroximetilaminometano (Aldrich)

*Los reactivos empleados en el presente trabajo fueron grado analítico y se utilizaron sin previa purificación.

4.2 Preparación de Disoluciones.

Las **disoluciones** empleadas en el presente trabajo se prepararon utilizando agua destilada, de acuerdo a los métodos descritos en la literatura.⁹⁰

- a) Medio de reacción: disolución amortiguadora pH 1.1. La disolución se preparó con 1.4 mL de una disolución de glicina 0.1 N/NaCl 0.1 N y llevando al aforo con agua destilada hasta un volumen de 25 mL. El pH de la disolución se ajustó con hidróxido de sodio 0.1 N previamente al aforo con ayuda de un potenciómetro.
- b) Medio de reacción: disolución amortiguadora pH 4.0. Esta disolución se preparó mezclando biftalato de potasio (0.1 M) con nitrato de potasio (0.1 M) (electrolito soporte). El pH de la disolución se ajustó potenciométricamente a 4.0 utilizando hidróxido de sodio 0.1 N. Finalmente se completa la disolución a un volumen de 25 mL con agua destilada.

- c) Medio de reacción: disolución amortiguadora pH 5.0. Se mezclaron aproximadamente 6.25 mL de una disolución de biftalato de potasio 0.2 M con 6 mL de una disolución de hidróxido de sodio 0.1 N ajustando el pH potenciométricamente. Finalmente se completa con agua destilada hasta un volumen de 25 mL.
- d) Medio de reacción: disolución amortiguadora pH 6.0. La preparación de este amortiguador consistió en agregar aproximadamente 3.03 mL de fosfato de potasio dibásico 0.066 M, llevando al aforo con fosfato de potasio monobásico 0.0066 M hasta un volumen de 25 mL. El pH de la disolución se verificó potenciométricamente.
- e) Medio de reacción: disolución amortiguadora pH 8.3. La disolución se preparó mezclando tris-hidroximetilaminometano (0.1 M) con nitrato de potasio (0.1 M). El pH de la disolución se determinó con un potenciómetro.
- f) Disolución estándar de GSH 10 mM. Se prepararon 5 mL de disolución estándar de GSH para cada uno de los experimentos al momento de realizarlos. La disolución se preparó disolviendo aproximadamente 15.4 mg de GSH en 5 mL del respectivo medio de reacción.
- g) Disolución estándar de GSSG 10 mM. Esta disolución se generó *in situ*, por oxidación de una disolución de GSH. El procedimiento consistió en burbujear aire a la disolución de GSH por 30 minutos. La formación de GSSG se verificó mediante voltamperometría cíclica.
- h) Disolución estándar de GSH 0.1 M. Se prepararon 25 mL de disolución estándar de GSH para cada uno de los experimentos al momento de realizarlos. La disolución se preparó disolviendo aproximadamente 0.77 g de GSH en 25 mL del respectivo medio de reacción
- i) Estándares de GSH. Los estándares de GSH se prepararon por dilución a partir de una disolución patrón de GSH 0.1 M utilizando el respectivo medio de reacción. Las concentraciones de los estándares fueron: 1×10^{-1} M, 1×10^{-2} M,

5×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M y 1×10^{-6} M.

- j) Disolución estándar de GSSG 0.1 M. Esta disolución se generó *in situ*, por oxidación de una disolución estándar de GSH. El procedimiento consistió en burbujear aire a la disolución de GSH por 30 minutos. La formación de GSSG se verificó mediante voltamperometría cíclica.
- k) Estándares de GSSG. Los estándares de GSSG se prepararon por dilución partiendo de una disolución patrón de GSSG 0.1 M preparada *in situ* como se mencionó anteriormente. Las concentraciones de los estándares fueron las mismas que para GSH.
- l) Disolución de GSH (concentración variable) + GSSG 1×10^{-3} M. Se prepararon diferentes disoluciones estándar de esta mezcla manteniendo la concentración de GSSG constante (1×10^{-3} M). Las concentraciones de GSH fueron: 1×10^{-1} M, 1×10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M y 1×10^{-6} M.
- m) Disolución de GSH (concentración variable) + GSSG 1×10^{-4} M. En este caso la concentración de GSSG fue de 1×10^{-4} M para cada uno de los estándares, mientras que las concentraciones de los estándares de GSH fueron iguales al punto anterior.
- n) Disolución de $[\text{Hg}]_{\text{T}}$ 0.05 M. Se disolvieron aproximadamente 0.1 g de mercurio metálico en 0.5 mL de ácido nítrico concentrado, posteriormente se llevaron al aforo con agua destilada hasta un volumen de 10 mL.
- o) Disolución de $[\text{Hg}]_{\text{T}}$ 0.5 M. Se disolvió aproximadamente 1 g de mercurio metálico en 5 mL de ácido nítrico concentrado, la disolución se llevo al aforo hasta un volumen de 10 mL.

4.3 Equipos y Materiales.

4.3.1 Electrodo.

En los experimentos realizados en el presente trabajo se empleó un arreglo de tres electrodos.

Electrodo de trabajo.

En la primera parte del trabajo se utilizó un disco de cobre de 0.2 cm de diámetro sobre el cual se depositó una capa de mercurio por electrólisis.

Posteriormente se utilizaron dos electrodos giratorios de disco, el primero de ellos con un diámetro de 0.3 cm (1), y el segundo con un diámetro de 0.2 cm marca Tacussel (2), ambos de oro, soportados en una base de teflón (Figura 4.1)

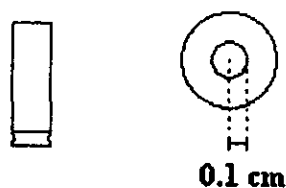


Figura 4.1. Electrodo giratorio de disco de oro. Superficie del disco de oro 0.0314 cm².

Electrodo de referencia.

Se utilizó como referencia el sistema Ag/AgCl en presencia de KCl 0.1 F. En la figura 4.2 se muestra un diseño de este electrodo. Su estabilidad sobrepasa dos semanas de trabajo, sin embargo es conveniente cambiar la disolución de KCl por semana, así como regenerar la capa de AgCl depositada por electrólisis sobre el alambre de plata.

El potencial del electrodo de referencia medido contra el electrodo de calomel saturado fue de:

$$E = E_{\text{AgCl/Ag}} - E_{\text{C.S.}} = 0.2 \text{ V}$$

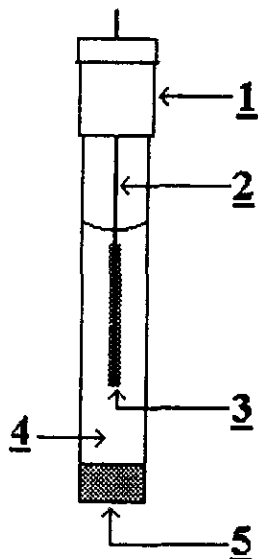


Figura 4.2. Electrodo de referencia AgCl/Ag, KCl 0.1 F. 1: Tapón de goma. 2: Alambre de plata. 3: Recubrimiento de AgCl. 4: Disolución de KCl 0.1 F. 5: Membrana porosa polimérica.

Electrodo auxiliar.

En la primera parte del trabajo se utilizó como electrodo auxiliar una mina de grafito. En las etapas posteriores se utilizó como electrodo auxiliar una barra de acero de 0.1 cm de diámetro.

4.3.2 Celda de Trabajo.

Tanto en los experimentos de voltamperometría cíclica y cronoamperometría como en los de potenciometría, se utilizó una celda de 10 mL de capacidad (figura 4.3). En los experimentos de voltamperometría cíclica y cronoamperometría el volumen de la muestra fue de 5 mL, mientras que para los estudios potenciométricos fue de 1 mL.

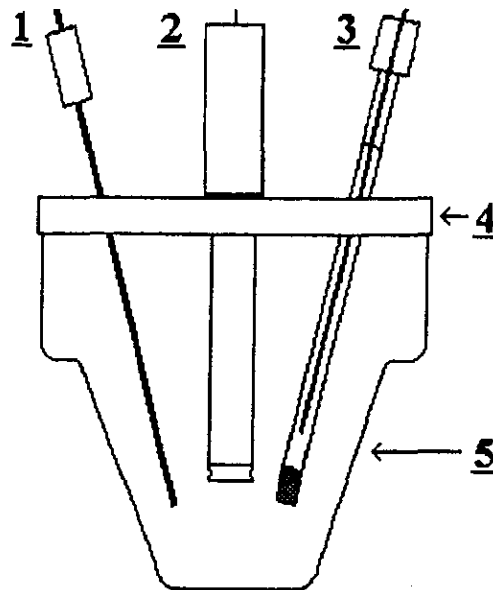


Figura 4.3. Celda de trabajo. 1: Electrodo auxiliar (acero). 2: Electrodo de trabajo (Electrodo de disco giratorio de disco con capa de mercurio, TLME). 3: Electrodo de referencia AgCl/Ag, KCl 0.1 F. 4: Empaque hule-teflón. 5: Celda de trabajo (capacidad 10 mL).

4.3.3 Equipos Utilizados.

- Balanza analítica marca OHAUS.
- Potenciómetro marca ORION 701 A
- Los experimentos de voltamperometría cíclica, cronoamperometría, cronoamperometría de doble pulso y los potenciométricos, se realizaron con un potenciostato-galvanostato Radiometer Copenhagen.
- Fuente de poder modelo FP-LAB2.

4.4 Descripción de los Experimentos Realizados.

4.4.1 Formación del TLME.

Esta primera etapa experimental se enfocó al estudio de los diferentes factores que intervienen en la obtención de la película delgada de mercurio (TLME) sobre la cual se formará el complejo glutatión-mercurio.

4.4.1.1 Formación del TLME sobre disco de cobre.

En una primera serie de experimentos se planteó la posibilidad de formar el TLME sobre la superficie de un disco de cobre. Las razones de utilizar este metal fueron la facilidad de formación de la amalgama y el hecho de que el cobre es un metal de uso común muy accesible.

En el presente trabajo se utilizó un alambre de cobre de 10 cm de longitud y 0.2 cm de diámetro (0.0314 cm^2 de superficie de trabajo). En la figura 4.4 se muestra el diseño del disco de cobre utilizado.

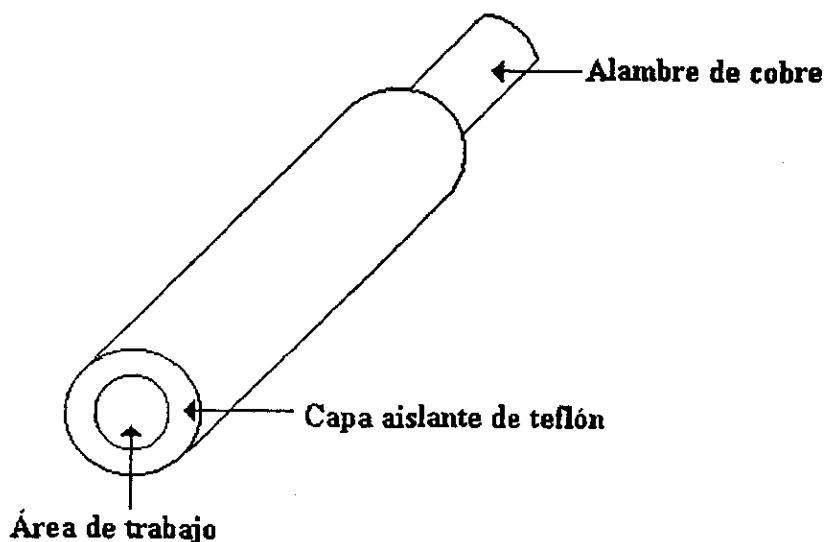


Figura 4.4. Electrodo de disco de cobre.

La formación de la capa delgada de mercurio sobre el disco de cobre se llevó a cabo vía electrolítica, utilizando una fuente de poder modelo FP-LAB2. El procedimiento experimental fue el siguiente:

El disco de cobre se sumergió en una solución de $[\text{Hg}(\text{II})]_{\text{T}}=0.1 \text{ M}$ por 3 segundos, aplicando una diferencia de potencial suficiente para promover la electrodeposición del mercurio sobre la superficie de cobre.

El tratamiento previo que se le dio al alambre de cobre fue el siguiente.

- 1) Se lavó varias veces la superficie del disco de cobre con ácido nítrico concentrado y posteriormente se enjuagó con abundante agua destilada.

2) Inmediatamente se procedió a pulir la superficie utilizando lijas finas hasta obtener en la medida de lo posible una apariencia de espejo.

El electrodo de referencia utilizado fue el de Ag/AgCl, KCl 0.1 M, mientras que el auxiliar fue de grafito (ambos se preparan de acuerdo a la sección 4.3.1 de este trabajo).

Con la finalidad de comprobar la utilidad del TLME formado sobre el disco de cobre, se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica del GSH, esperando obtener las ondas redox características del sistema glutatión.

Las condiciones generales fueron las siguientes:

- Muestra: Disolución estándar de GSH 10 mM en medio de reacción.
Medio de reacción: Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en diferentes disoluciones amortiguadoras de pH (1.1, 4.0, 5.0, 6.0, 8.3).
Electrodos: De trabajo: TLME sobre disco de cobre.
De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M.
Auxiliar: grafito.
Velocidad de barrido: 500 mV/s.

En cada uno de los experimentos el TLME se regeneró previamente lavando con ácido nítrico y puliendo la superficie del disco de cobre.

4.4.1.2 Formación del TLME sobre disco de oro.

La segunda etapa experimental del proyecto, consistió en la obtención de un TLME formado sobre la superficie de un electrodo giratorio de disco (EGD) de oro cuyas principales ventajas sobre el disco de cobre son la alta pureza del metal y la agitación controlada que se logra obtener.

De esta manera, y tomando como referencia los experimentos realizados sobre el disco de cobre se manejaron las siguientes variables con el fin de obtener un TLME funcional y reproducible para los fines del proyecto:

- a) Limpieza y pulido del disco giratorio de oro.

Básicamente la limpieza del electrodo se realizó en tres etapas: en la primera de ellas, se efectuó una serie de lavados con ácido nítrico concentrado. La segunda etapa consistió en el pulido de la superficie del disco de oro con lijas finas hasta lograr la apariencia de espejo (es necesario resaltar la importancia de este punto, ya que la uniformidad de la superficie es esencial para la formación de la capa delgada de mercurio). Finalmente, en la tercera etapa se realiza una limpieza electrolítica del EGD de oro imponiendo un potencial de +800 mV por 15 minutos seguido de uno más a -200 mV por 15 minutos en nitrato de potasio como electrolito soporte.

b) Agitación.

Se realizaron tres experimentos variando la agitación de la electrodeposición del mercurio sobre el EGD de oro, a 1000 rpm, a 500 rpm y sin agitación. Cada uno de los experimentos se monitoreó por cronoamperometría.

c) Tiempo de electrodeposición.

El perfil cronoamperométrico permite determinar el tiempo necesario de electrodeposición.

Las condiciones generales de esta serie de experimentos fue la siguiente:

Muestra: Disolución de $[Hg(II)]_T = 0.05$ M en medio de reacción.

Medio de reacción: Disolución de HNO_3 0.5 M

Electrodos: De trabajo: EGD de oro.

De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M.

Auxiliar: acero.

Agitación: 500 rpm y sin agitación

4.4.1.3 Concentración de $[Hg(II)]_T$.

La concentración analítica de la disolución de $Hg(II)$ juega un papel importante en la calidad de la película de mercurio depositada. En el presente trabajo se utilizaron dos diferentes concentraciones, de 0.05 M y de 0.5 M. Los

experimentos se monitorearon por cronoamperometría; las condiciones generales fueron las siguientes:

Muestra:	Disolución de $[\text{Hg(II)}]_{\text{T}} = 0.05 \text{ M}$ y 0.5 M en medio de reacción.
Medio de reacción:	Disolución de HNO_3 0.5 M
Electrodos:	De trabajo: EGD de oro. De referencia: Ag/AgCl , KCl 0.1 M . Auxiliar: acero.
Agitación:	Sin agitación

4.4.2 Voltamperometría Cíclica.

Una de las herramientas más utilizadas en análisis electroquímicos es la voltamperometría cíclica. En el presente trabajo ésta se utilizó en primera instancia, para determinar la funcionalidad de los TLME obtenidos. Posteriormente se utilizó para estudiar la formación del complejo glutatión-mercurio y para plantear las condiciones experimentales necesarias para la obtención de una película de complejo adecuada a los propósitos del proyecto.

4.4.2.1 Dominio de electroactividad.

Se trazaron las curvas de voltamperometría cíclica correspondientes utilizando las condiciones generales siguientes:

Muestra:	Medio de reacción.
Medio de reacción:	Electrolito soporte KNO_3 0.1 M , en diferentes disoluciones amortiguadoras de pH (4.0, 8.0).
Electrodos:	De trabajo: TLME sobre disco de oro. De referencia: Ag/AgCl , KCl 0.1 M . Auxiliar: acero.
Velocidad de barrido:	500 mV/s .
E_0 :	Potencial libre.

E_1 : -750 mV.

E_2 : -100 mV.

4.4.2.2 Voltamperometría cíclica de GSH.

Una vez obtenido el dominio de electroactividad, se procedió a estudiar los procesos redox del glutatión partiendo de su forma reducida.

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Muestra: Disolución de GSH 10 mM en medio de reacción.
 Medio de reacción: Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en diferentes disoluciones amortiguadoras de pH (4.0, 8.0).
 Electrodo(s): De trabajo: TLME sobre disco de oro.
 De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M.
 Auxiliar: acero.
 Velocidad de barrido: 500 mV/s.
 E_0 : Potencial libre.
 E_1 : -750 mV.
 E_2 : -100 mV.
 Ciclos: 10.

4.4.2.3 Voltamperometría cíclica de GSSG.

Se trazaron los voltamperogramas cíclicos del GSSG generado *in situ* partiendo de una disolución de GSH oxidada mediante burbujeo de aire como se indica en la sección de preparación de disoluciones. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Muestra: Disolución de GSH 10 mM en medio de reacción.
 Medio de reacción: Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en diferentes disoluciones amortiguadoras de pH (4.0, 8.0).
 Electrodo(s): De trabajo: TLME sobre disco de oro.
 De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M.

	Auxiliar: acero.
Velocidad de barrido:	500 mV/s.
E ₀ :	Potencial libre.
E ₁ :	-750 mV.
E ₂ :	-100 mV.
Ciclos:	10.

4.4.2.4 Voltamperometría cíclica del complejo glutatión-mercurio.

El procedimiento consistió en obtener una capa de complejo formada por la repetición de ciclos voltamperométricos partiendo de una disolución de GSH. Después de 15 ciclos el electrodo de trabajo se retiró de la disolución y se enjuagó con abundante agua destilada. Posteriormente se sumergió en medio de reacción (sin GSH) y se trazó su correspondiente voltamperograma cíclico, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Muestra:	Medio de reacción.
Medio de reacción:	Electrolito soporte KNO ₃ 0.1 M, en diferentes disoluciones amortiguadoras de pH (4.0, 8.0).
Electrodos:	De trabajo: complejo Hg-GSH formado <i>in situ</i> en TLME sobre disco de oro. De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M. Auxiliar: acero.
Velocidad de barrido:	500 mV/s.
E ₀ :	Potencial libre.
E ₁ :	-750 mV.
E ₂ :	-100 mV.
Ciclos:	1.

4.4.3 Formación de la Capa Glutatión-Mercurio por Cronoamperometría de Doble Pulso.

4.4.3.1 Programa de perturbación empleado en cronoamperometría.

Basándose en los voltamperogramas obtenidos tanto para GSH como para GSSG, se diseñó el programa de perturbación empleado en los experimentos de cronoamperometría con el objetivo de obtener la capa del complejo glutatión-mercurio. En la figura 4.5 se representa el programa de perturbación utilizado.

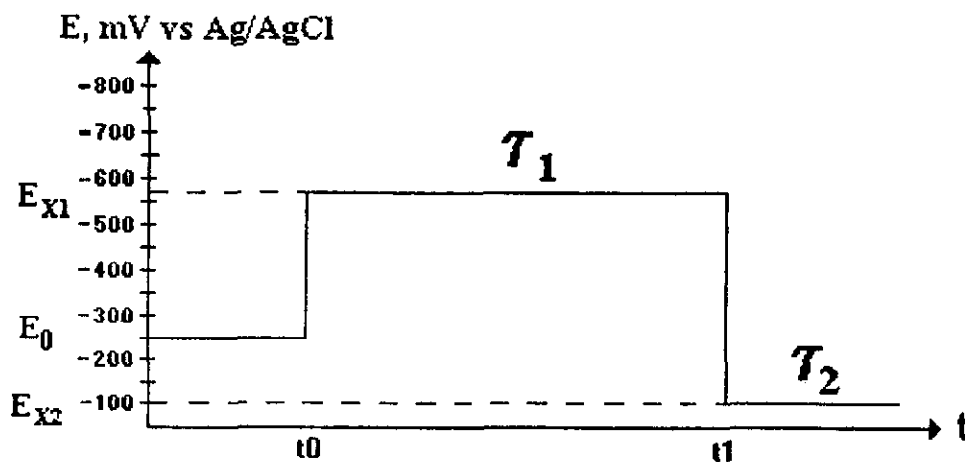


Figura 4.5 Programa de perturbación de cronoamperometría de doble pulso.

Las condiciones generales fueron las siguientes:

$$E_0 = \text{potencial libre} \approx -250 \text{ mV}$$

$$E_{X1} = -570 \text{ mV}$$

$$E_{X2} = -100 \text{ mV}$$

Los tiempos de duración de los pulsos de potencial τ_1 y τ_2 se variaron de acuerdo a cada experimento. Los TLME se regeneran para cada uno de los experimentos como se describe en el inciso 4.4.1.

4.4.3.2 Cronoamperometría de doble pulso.

En base al programa de perturbación se establecieron las condiciones necesarias para formar la capa del complejo glutatión-mercurio sobre la superficie del TLME, utilizando cronoamperometría de doble pulso. En la primera etapa se impone un potencial de -570 mV, durante un tiempo τ_1 , posteriormente se impone un segundo pulso de potencial a -100 mV en un tiempo τ_2 .

Las condiciones generales fueron las siguientes:

Muestra:	Disolución de GSH 10 mM en medio de reacción.
Medio de reacción:	Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en disolución amortiguadora de pH 4.0.
Electrodos:	De trabajo: TLME sobre disco de oro. De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M. Auxiliar: acero.
Agitación:	Sin agitación.
E_0 :	Potencial libre ≈ -250 mV
E_{X1} :	-570 mV
E_{X2} :	-100 mV
τ_1 :	1, 5, 10, 15, 20 minutos.
τ_2 :	Tiempo necesario para que la formación de la capa del complejo GS-Hg sature la superficie del TLME.

4.4.3.3 Cronoamperometría de doble pulso con dos ciclos.

Las condiciones experimentales de esta serie de experimentos fueron las siguientes:

Experimento #1

Muestra: Disolución de GSH 10 mM en medio de reacción.

Medio de reacción:	Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en disolución amortiguadora de pH 4.0.
Electrodos:	De trabajo: TLME sobre disco de oro. De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M. Auxiliar: acero.
Agitación:	Sin agitación.
Primer ciclo:	
E_0 :	Potencial libre ≈ -250 mV
E_{x1} :	-570 mV
E_{x2} :	-100 mV
τ_1 :	15 minutos.
τ_2 :	10 minutos.
Segundo ciclo:	
E_0 :	Potencial libre ≈ -250 mV
E_{x1} :	-570 mV
E_{x2} :	-100 mV
τ_1 :	15 minutos.
τ_2 :	Tiempo necesario para completar la formación de la capa del complejo GS-Hg.

Experimento #2

Condiciones experimentales:

Muestra:	Disolución de GSH 10 mM en medio de reacción.
Medio de reacción:	Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en disolución amortiguadora de pH 4.0.
Electrodos:	De trabajo: TLME sobre disco de oro. De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M. Auxiliar: acero.
Agitación:	Sin agitación.

Primer ciclo:

E_0 :	Potencial libre ≈ -250 mV
E_{x1} :	-570 mV
E_{x2} :	-100 mV
τ_1 :	15 minutos.
τ_2 :	Tiempo necesario para que la formación de la capa del complejo GS-Hg sature la superficie del TLME.

Segundo ciclo:

E_0 :	Potencial libre ≈ -250 mV
E_{x1} :	-570 mV
E_{x2} :	-100 mV
τ_1 :	15 minutos.
τ_2 :	10 minutos.

4.4.4 Eficiencia del Electrodo de Capa del Complejo glutatión-mercurio.

La eficiencia del electrodo obtenido a partir de la formación de la capa constituida por el complejo, fue determinada a partir de la relación de Nikolsky.

4.4.4.1 Determinación de la ecuación de Nikolsky.**A) Utilizando GSH como analito.**

La parte experimental consistió en la preparación de disoluciones estándar de GSH, y posteriormente la medición de su potencial utilizando los electrodos selectivos de capa de glutatión-mercurio, construidos sobre los TLME 1 y 2. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Muestra:	Estándares de GSH 10^{-1} – 10^{-6} M en medio de reacción.
Medio de reacción:	Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en disolución amortiguadora de pH 4.0.

Electrodos: De trabajo: electrodo selectivo de GS-Hg.
 De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M.
 Auxiliar: acero.

Agitación: Sin agitación.

B) Utilizando GSSG como analito.

En esta etapa las disoluciones estándares fueron de GSSG generado *in situ* partiendo de GSH. El procedimiento es el mismo que para el GSH.

4.4.5 Determinación de la Constante de Selectividad.

La determinación de la constante de selectividad consistió en la medición del potencial de una serie de disoluciones estándar de GSH, a las que se les agregó una cantidad constante de GSSG como interferente. Las condiciones experimentales fueron las siguientes.

A) Interferente GSSG, pGSSG=3.

Muestra: Estándares de GSH 10^{-1} - 10^{-6} M en medio de reacción.
 Interferente: Estándar de GSSG 10^{-3} M.
 Medio de reacción: Electrolito soporte KNO_3 0.1 M, en disolución amortiguadora de pH 4.0.
 Electrodo: De trabajo: electrodo selectivo de GS-Hg.
 De referencia: Ag/AgCl, KCl 0.1 M.
 Auxiliar: acero.

Agitación: Sin agitación y a 500 rpm.

B) Interferente GSSG, pGSSG=4.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que en el experimento anterior a excepción de la concentración del interferente, el cual en este caso fue de 10^{-4} M.

4.4.6 Estudio del Tiempo de Respuesta del Electrodo del Complejo Glutati6n-Mercurio.

Se estudi6 la variaci6n del potencial en funci6n del tiempo. Los experimentos realizados consistieron en la medici6n del potencial cada dos segundos hasta obtener lecturas constantes. Para ello, se utilizaron soluciones est6ndar de GSH en el intervalo de trabajo. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se emplearon en el estudio de la relaci6n de Nikolsky.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El electrodo selectivo a glutatión consiste en una capa formada por el complejo $[\text{Hg}(\text{GSH})_x]$ adsorbida a la superficie de una película de mercurio (TLME). Esta película se depositó sobre dos matrices diferentes: en primer lugar, uno constituido por un disco de cobre proveniente de un alambre de cobre de uso comercial y otro formado por un electrodo de disco giratorio de oro. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

5.1 Formación del TLME sobre Electrodo de Disco de Cobre.

En esta primera sección se construyó un TLME sobre la superficie de un disco de cobre partiendo de un alambre de cobre de 0.2 cm de diámetro de uso común.

Con el objetivo de reproducir el TLME se construyeron tres electrodos de disco de cobre con las mismas características.

La electrodeposición del mercurio sobre la superficie del disco de cobre se llevó a cabo imponiendo un potencial de aproximadamente 4 V por 3 segundos al disco de cobre sumergido en una disolución de $[\text{Hg}(\text{II})]_{\text{T}} 0.05 \text{ M}$. Para los tres electrodos empleados se utilizaron las mismas condiciones experimentales.

Es importante la preparación previa de la superficie del disco de cobre en la cual se forma la capa de mercurio. Si no se logra obtener una superficie del disco de cobre lo suficientemente homogénea la capa de mercurio depositada presenta irregularidades en su superficie, esto resulta inconveniente para los fines del proyecto como se analizará más adelante.

Se lograron obtener tres TLME en los cuales la capa de mercurio, depositada sobre la superficie del disco de cobre se observa a simple vista homogénea.

Con el propósito de probar la utilidad de los TLME construidos se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica de disoluciones de GSH

10 mM en diferentes medios amortiguados (pH 1.1, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0). Por otra parte, esta serie de experimentos voltamperométricos permitió comprobar la posibilidad de generar un electrodo selectivo a glutatión a partir de la capa compuesta por un complejo formado entre el glutatión y el mercurio del TLME.

La figura 5.1 muestra un voltamperograma cíclico típico de GSH obtenido utilizando el TLME generado sobre el electrodo de cobre. En esta figura se puede observar una onda de oxidación aproximadamente en -498 mV (I) que posiblemente corresponda a la formación del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$. Alrededor de -585 mV se observa una onda de reducción (II) y otra señal en -704 mV (III). Una de estas ondas de reducción es muy probable que corresponda al paso de GSSG a GSH y quizás la otra sea la asociada a la reducción del complejo regenerando GSH.

El voltamperograma de la figura 5.1 muestra que a medida que aumenta el número de ciclos las ondas tienden a obedecer un comportamiento característico asociado a un proceso de formación de una monocapa sobre la superficie del electrodo. Posiblemente, la capa formada sobre la superficie del mercurio consiste en moléculas del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$.

El aspecto físico que presentó la superficie del electrodo una vez formada la capa del complejo fue de una delgada película de color blanco mate diferente a la superficie del mercurio en su estado metálico

La capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ puede ser utilizada para detectar selectivamente GSH; sin embargo, presentó un serio problema de estabilidad ya que después de 24 horas la superficie del electrodo empezó a oscurecerse, posiblemente debido a la adsorción de contaminantes. Existen además dos factores muy importantes que afectan la estabilidad de este tipo de electrodos, uno de ellos es la solubilidad del mercurio en el cobre⁸³ que ocasiona la destrucción de la capa formada por el mercurio sobre la superficie del disco de cobre a medida que transcurre el tiempo.

Otro de los factores lo conforman los diferentes procesos que en soluciones ácidas o básicas presenta el cobre provocando que sea un material inadecuado para nuestros propósitos.

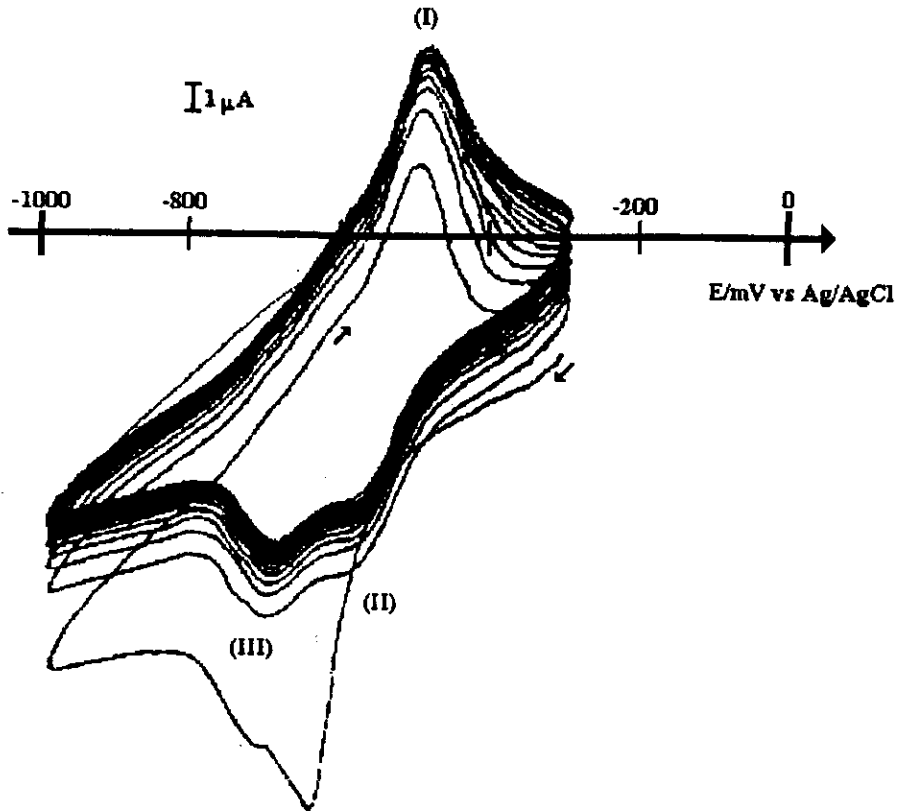


Figura 5.1 Voltamperograma cíclico de GSH 10 mM. Medio de reacción biftalato de potasio + KNO_3 0.1 M, $\text{pH}=4$. Electrodo de trabajo: TLME, sobre disco de cobre; electrodo de referencia: Ag/AgCl ; electrodo auxiliar: grafito. $E_0 = -307$ mV, $E_1 = -1000$ mV, $E_2 = -307$ mV. Velocidad de barrido 500 mV/s

5.2 Formación del TLME sobre Electrodo de Disco de Oro.

La segunda alternativa planteada para obtener la matriz necesaria en la formación del electrodo selectivo fue la utilización de un electrodo de disco de oro, en cuya superficie se depositó una película de mercurio por electrólisis (potencial

impuesto: -160 mV) formando de esta manera el TLME necesario para obtener el electrodo selectivo propuesto.

Esta matriz de oro tiene la ventaja de que ha sido utilizada en muchos estudios redox por lo su comportamiento en solución es bien conocido.⁹¹ Por otra parte, tiene una alta pureza gracias a la cual se elimina la interferencia de posibles contaminantes y además permite controlar la agitación del proceso.

En el presente trabajo se utilizaron dos electrodos de disco de oro, el primero de ellos, identificado como electrodo 1, fue construido en el laboratorio utilizando una barra de oro de 1 cm de longitud y 0.1 cm de radio montada sobre un soporte de teflón diseñado de acuerdo al electrodo giratorio Tacussel (figura 4.1 sección experimental). El segundo electrodo utilizado, identificado como 2, fue de 0.05 cm de radio de uso comercial marca Tacussel.

El diseño experimental permitió obtener TLME con las características adecuadas para formar el electrodo selectivo. Es necesario aclarar que con ambos electrodos se obtuvieron resultados satisfactorios; sin embargo, el TLME formado sobre el electrodo 2 presentó una mayor estabilidad, posiblemente debida a su menor tamaño y mayor pureza.

Los puntos clave en la obtención del TLME fueron los siguientes:

a) Limpieza y pulido del disco de oro.

Como se comentó en la sección anterior la limpieza y pulido de la superficie del electrodo juegan un papel muy importante en los procesos al electrodo. Se probaron diferentes formas de limpieza del electrodo; sin embargo, la limpieza con ácido nítrico concentrado y la electrolítica permitieron eliminar residuos de contaminantes en la superficie del electrodo de una manera muy eficiente. Por otra parte, el uso de dos diferentes lijas y posteriormente el pulido con silica permitió obtener el aspecto de espejo en la superficie del disco de oro consiguiendo con esto una superficie homogénea adecuada para la electrodeposición del mercurio.

Es necesario aclarar la importancia del tratamiento previo a la superficie del disco de oro ya que precisamente esto permitió la reproducibilidad de los experimentos.

Además, existe una íntima relación entre la microestructura de la superficie del electrodo y las propiedades macroscópicas electroquímicas, las cuales son aprovechadas en técnicas como el electroanálisis y los sensores.

b) Proceso de electrodeposición del mercurio sobre el disco de oro.

La formación de la película de mercurio fue monitoreada utilizando la técnica de cronoamperometría imponiendo un potencial de -160 mV, ya que en éste potencial ocurre la reducción del mercurio (II) en las condiciones de trabajo.

El experimento cronoamperométrico arroja un perfil que describe el proceso de electrodeposición, este perfil permite determinar las condiciones óptimas de agitación, tiempo de electrodeposición y concentración de la solución de mercurio necesarias para la formación de la película.

i) Agitación en el proceso de electrodeposición.

En primer lugar es necesario establecer el régimen de agitación impuesto al sistema en la formación de la película de mercurio.

En una primera serie de experimentos la formación de la película de mercurio se llevó a cabo en régimen convectivo con una velocidad de giro del electrodo de 500 rpm.

La figura 5.2 muestra un cronoamperograma obtenido bajo estas condiciones experimentales, en él se puede observar un comportamiento característico de los procesos de nucleación (formación de capas de átomos o moléculas con determinado orden) del sustrato sobre la matriz. La forma en que se lleva a cabo la nucleación depende tanto de la matriz como del sustrato depositado.⁹²

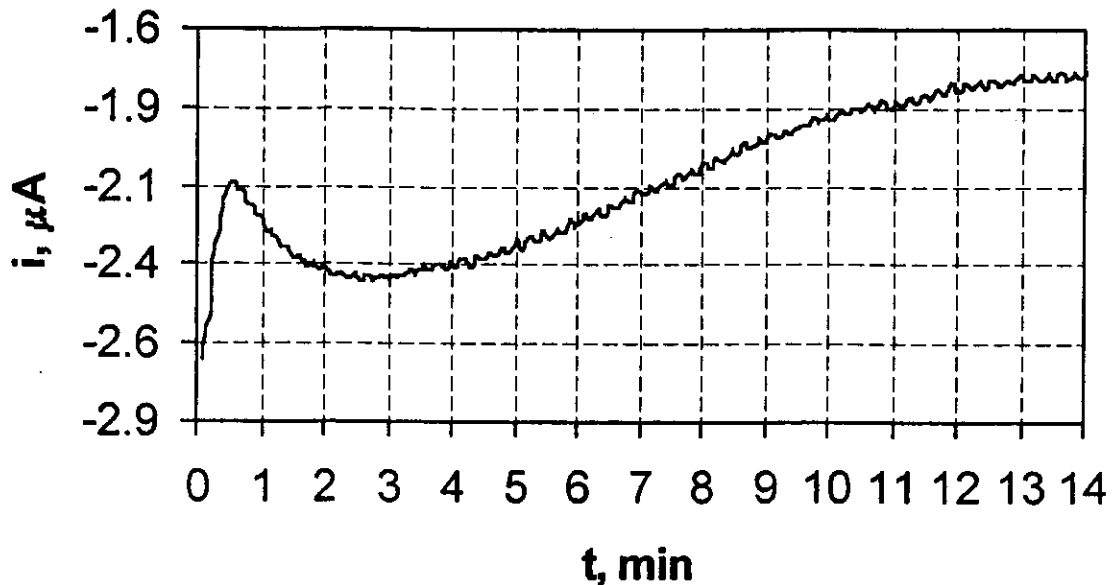


Figura 5.2. Perfil cromoamperométrico de la formación del TLME. Condiciones experimentales: $[Hg]_T = 0.05$ M, 500 rpm. Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

Existen muchos procesos de nucleación entre los más conocidos se encuentran los procesos 2D (formación de una capa con un crecimiento constante) y el 3D (capa generada una vez completado el proceso 2D). El comportamiento de los diferentes tipos de nucleación ha sido estudiado por cromoamperometría, generando modelos que describen los diferentes procesos. En el presente trabajo no se realizó un estudio a fondo para determinar el tipo de nucleación ya que se sale de los objetivos del proyecto; sin embargo, es indispensable retomar estos procesos ya que como se mencionó anteriormente las propiedades microscópicas del electrodo se relacionan directamente con sus propiedades macroscópicas.

Para los fines del proyecto, el perfil cromoamperométrico permite obtener un excelente control en la formación de la película de mercurio. En el caso de los experimentos realizados en régimen convectivo (500 rpm) y $[Hg]_T 0.05$ M los

cronoamperogramas presentan baja repetibilidad y ruido, este hecho puede ser observado en la figura 5.3 donde se presenta una comparación de varios cronoamperogramas obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. La causa aparente de este comportamiento se atribuye al régimen convectivo, por lo cual en la siguiente serie de experimentos se trabajó en régimen de difusión pura.

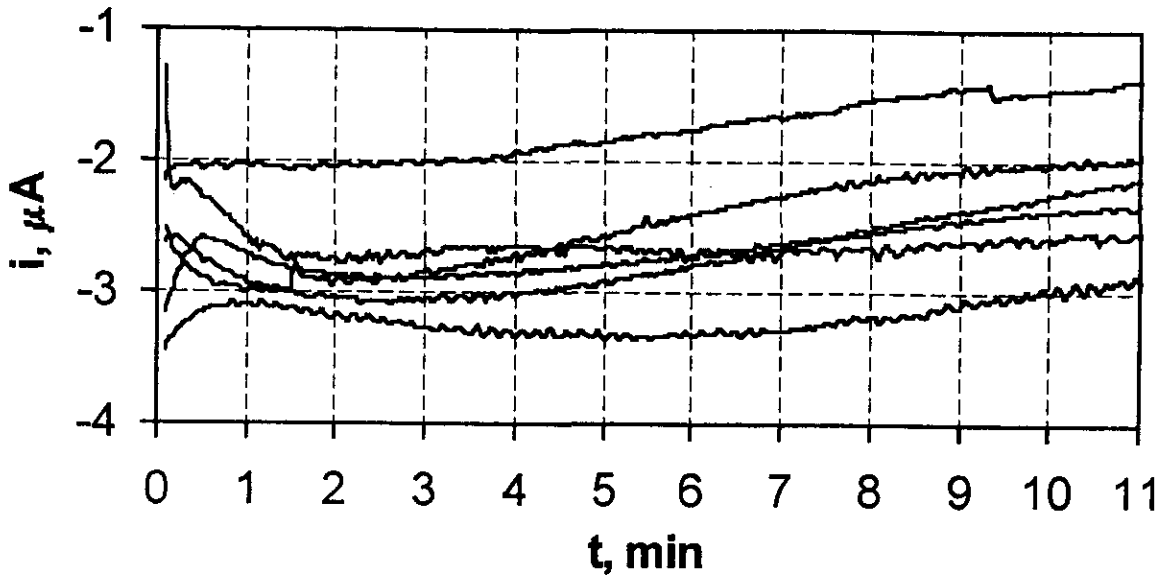


Figura 5.3. Diferentes perfiles cronoamperométricos obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. $[\text{Hg}]_{\text{T}} = 0.05 \text{ M}$, 500 rpm. Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

Bajo el régimen de difusión pura se logró obtener repetibilidad en la formación de la película de mercurio; sin embargo, la película así formada presentó irregularidades fácilmente observables a simple vista (combinación de zonas opacas y zonas brillantes) probablemente asociadas a una inadecuada nucleación ocasionada por irregularidades en la superficie del electrodo de oro, impurezas en la disolución de $\text{Hg}(\text{II})$ o incluso la concentración de esta solución. La figura 5.4 muestra un perfil cronoamperométrico obtenido bajo estas condiciones. Puede observarse que existe una gran diferencia con el cronoamperograma de la figura 5.2, ya que en régimen de difusión pura no se observa el comportamiento

característico de nucleación. Sin embargo, es posible que el proceso ocurra en tiempos muy cortos, de manera que estos no pueden ser registrados con el equipo utilizado. Por otra parte, se puede observar que el perfil cronoamperométrico de la figura 5.4 obedece la ecuación de Cottrell, ya que la corriente es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo. A partir del tratamiento de los datos se obtiene la siguiente ecuación:

$$i = -0.27 t^{1/2} - 0.07, r = 0.9964$$

Estos resultados sugieren que el proceso se encuentra controlado por difusión.

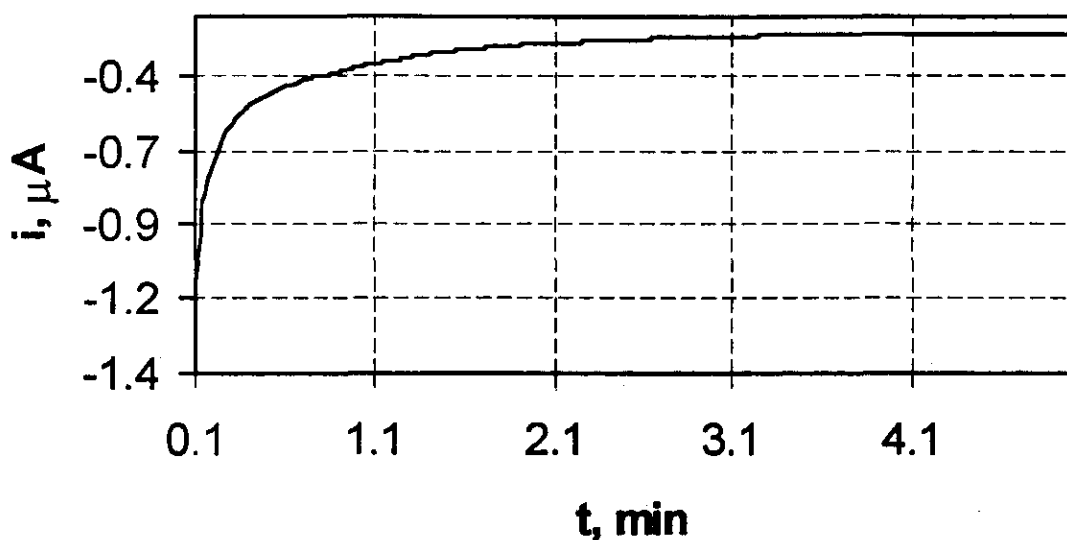


Figura 5.4 Perfil cronoamperométrico de la formación del TLME. Condiciones experimentales: $[Hg]_{T} = 0.05$ M, sin agitación. Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

En resumen, es un hecho que la agitación es un factor muy importante en la formación de la capa de mercurio. En nuestro caso, los mejores resultados se obtuvieron en régimen de difusión pura ya que en estas condiciones es posible obtener un perfil cronoamperométrico repetible lo que habla de un mejor control en la formación de la película.

ii) Tiempo de electrodeposición.

Un factor importante en la formación de la película de mercurio es el tiempo de electrólisis. El perfil cronoamperométrico permite determinar fácilmente el tiempo necesario para la electrólisis, el cual se establece cuando la corriente comienza a permanecer constante en el transcurso del tiempo. Por ejemplo, en el caso del cronoamperograma de la figura 5.4 la corriente empieza a permanecer constante aproximadamente a los 3 minutos después de comenzada la electrólisis. Ahora bien, para lograr obtener una película homogénea es recomendable permitir que la electrólisis continúe el doble del tiempo necesario para que la corriente alcance un valor constante.

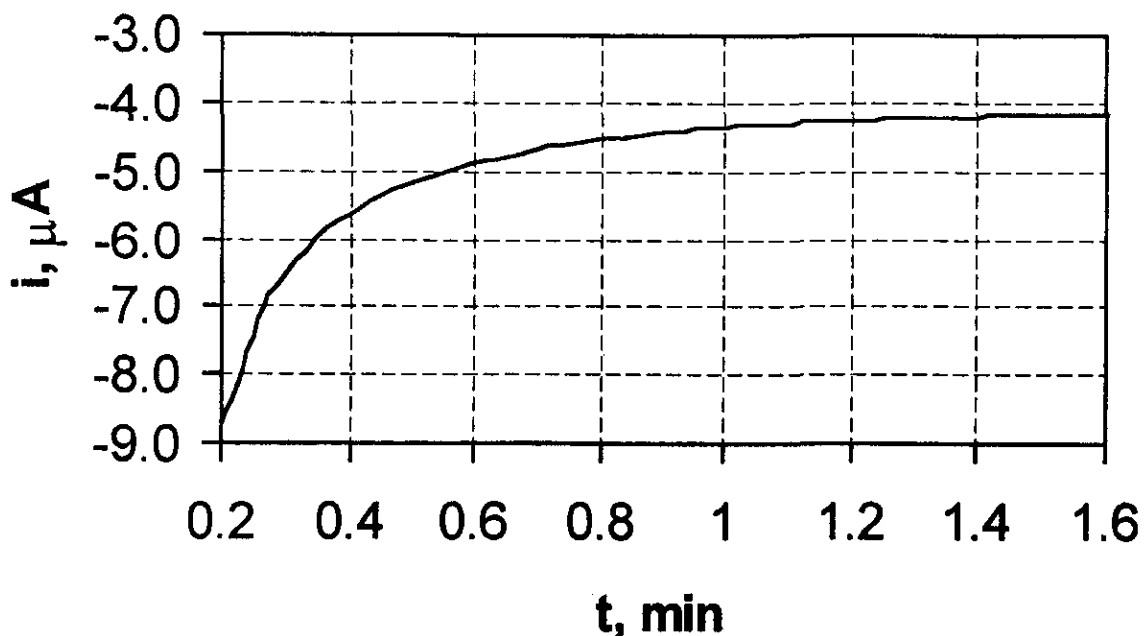


Figura 5.5 Perfil cronoamperométrico de la formación del TLME. Condiciones experimentales: $[\text{Hg}]_{\text{T}} = 0.5 \text{ M}$, sin agitación. Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

iii) Influencia de la concentración de $[\text{Hg(II)}]_{\text{T}}$.

En los experimentos anteriores se logró obtener un comportamiento cronoamperométrico repetible en el proceso de formación de la capa; sin embargo,

ésta presentaba ciertas irregularidades en su superficie. Con el fin de obtener una película homogénea se incrementó la concentración de la disolución de Hg(II)_T de 0.05 M a 0.5 M. El perfil cronoamperométrico se presenta en la figura 5.5.

Las películas de mercurio obtenidas bajo estas condiciones experimentales presentan una superficie homogénea adecuada a los propósitos del proyecto.

- j) Determinación del número de átomos de mercurio adsorbidos a la superficie del disco de oro.

Tomando en cuenta la importancia de la superficie de la película de mercurio depositada sobre el disco de oro en el desarrollo del electrodo selectivo se procedió a determinar el número de átomos de mercurio que conforman la película, logrando con esto obtener un mejor control del proceso de formación del TLME.

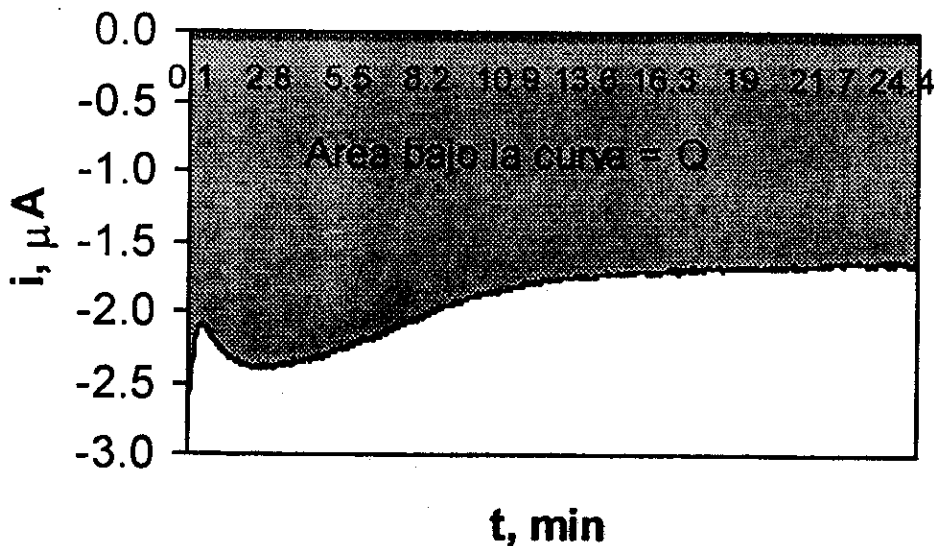


Figura 5.6. Determinación de la carga asociada a la formación de la película de mercurio mediante la integración bajo la curva.

El cálculo se basó en la ley de Faraday, la cual establece la relación entre la carga asociada a un proceso y la cantidad de materia que es transformada

electroquímicamente. De esta manera, los experimentos cronoamperométricos permiten determinar la carga del proceso redox mediante la integración bajo la curva del respectivo cronoamperograma. (figura 5.6). La integración se realizó utilizando el programa VoltaMaster versión X9523-2.31 (Radiometer Analytical).

Posteriormente utilizando la ley de Faraday y conociendo el número de electrones intercambiados en la reacción así como el número de Avogadro y el área del electrodo es posible obtener el número de átomos de mercurio que forman el TLME.

Ley de Faraday:

$$Q = nFm$$

Donde:

Q = carga [C]

n = número de electrones = 2

F = constante de Faraday = 96490 C/mol e^-

m = cantidad mol de sustancia transformada en el proceso [mol]

Por consiguiente:

$$m = Q/nF$$

y el número de átomos de Hg en el TLME se obtiene de:

$$\# \text{ átomos de Hg} = m(N.A.)/A$$

N.A. = número de Avogadro.

A = área del electrodo = $7.854 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$

Se determinó la carga correspondiente al medio de reacción la cual fue restada a cada uno de los valores obtenidos en los diferentes experimentos.

Tabla 5.1. Determinación de la carga promedio del medio de reacción.

Blanco	Q (mC)	Q prom (mC)	Desv. estándar	C.V.(%)
1	8.49	8.46	0.52	6.19
2	8.43			
3	7.67			
4	8.60			
5	9.13			

La figura 5.7 muestra el perfil cronoamperométrico del medio de reacción comparado con el correspondiente al perfil obtenido en la formación de la película de mercurio, se puede observar que la contribución a la carga por parte del medio de reacción es prácticamente despreciable.

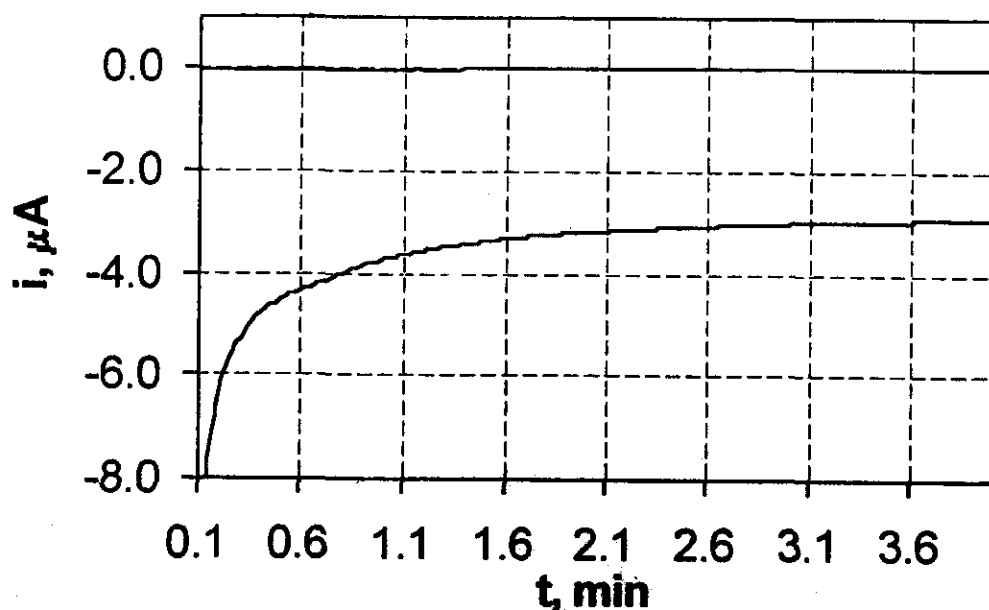


Figura 5.7 Comparación entre el perfil cronoamperométrico del blanco y una muestra. Blanco: ácido nítrico 0.7 M (línea gruesa); muestra: disolución de Hg(II) 0.5 M en ácido nítrico 0.7 M (línea delgada). Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

En las siguientes tablas se presentan agrupados de acuerdo a las condiciones experimentales los resultados obtenidos del cálculo de número de átomos de mercurio en el TLME.

Tabla 5.2. Número de átomos en el TLME, condiciones experimentales: 500 rpm, $[\text{Hg(II)}]_{\text{T}} = 0.05 \text{ M}$

Experimento	Q(C)	Átomos/cm ²	Promedio	Desv. Estándar	%C.V.
1	2.86	2.80×10^{17}	2.38X10 ¹⁷	0.6X10 ¹⁷	29.05
2	2.47	2.41×10^{17}			
3	3.45	3.37×10^{17}			
4	2.43	2.37×10^{17}			
5	1.76	1.71×10^{17}			
6	1.33	1.30×10^{17}			
7	2.74	2.68×10^{17}			

Tabla 5.3. Número de átomos en el TLME, condiciones experimentales: sin agitación, $[\text{Hg(II)}]_{\text{T}} = 0.05 \text{ M}$

Experimento	Q(C)	Átomos/cm ²	Promedio	Desv. Estándar	%C.V.
1	0.40	3.82×10^{16}	3.80X10 ¹⁶	0.12X10 ¹⁶	3.22
2	0.40	3.81×10^{16}			
3	0.40	3.86×10^{16}			
4	0.38	3.64×10^{16}			
5	0.38	3.66×10^{16}			
6	0.41	3.97×10^{16}			
7	0.40	3.87×10^{16}			

Tabla 5.4. Número de átomos en el TLME, condiciones experimentales: sin agitación, $[\text{Hg(II)}]_{\text{T}} = 0.5 \text{ M}$

Experimento	Q(C)	Átomos/cm ²	Promedio	Desv. Estándar	%C.V.
1	4.54	4.44×10^{17}	4.42 $\times 10^{17}$	0.08 $\times 10^{17}$	1.78
2	4.44	4.34×10^{17}			
3	4.61	4.51×10^{17}			
4	4.42	4.33×10^{17}			
5	4.55	4.45×10^{17}			

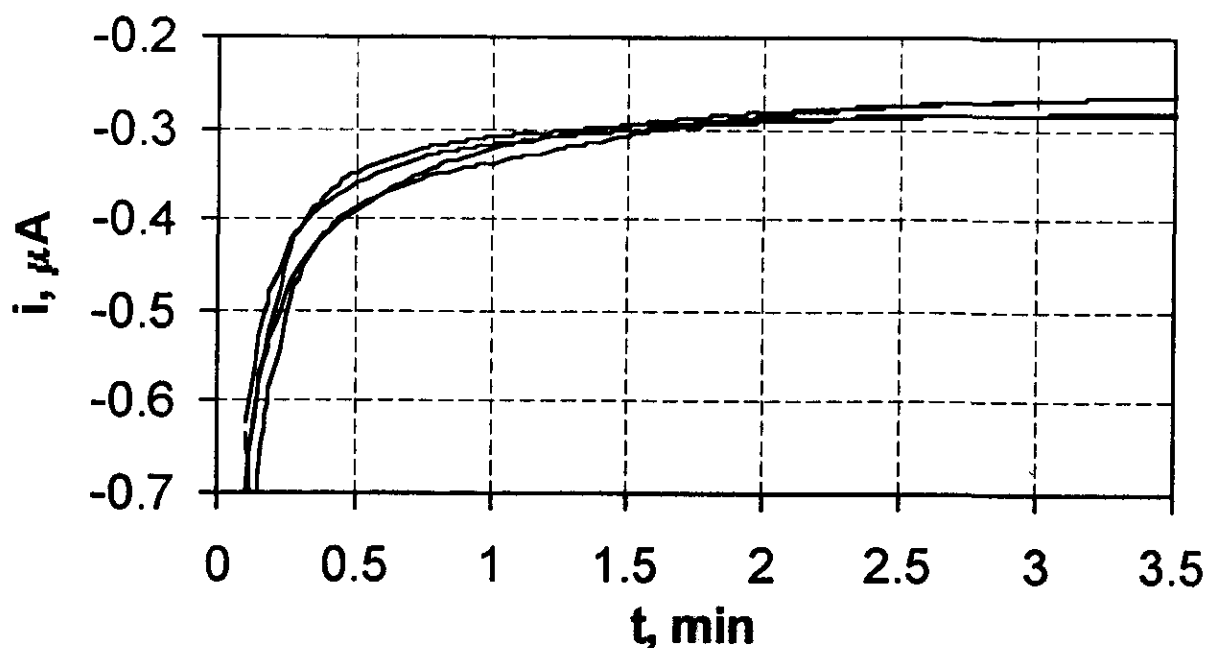


Figura 5.8. Diferentes perfiles cronoamperométricos obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. $[\text{Hg}]_{\text{T}} = 0.05 \text{ M}$, sin agitación. Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

Los resultados obtenidos muestran baja repetibilidad cuando el régimen utilizado es convectivo, lo cual se había observado en los perfiles cronoamperométricos correspondientes (figura 5.3). No obstante, cuando el

régimen utilizado es difusión pura los resultados obtenidos en términos de repetibilidad son mucho mejores. Esto puede ser comprobado en la figura 5.8 donde se presenta el perfil cronoamperométrico comparativo para esta serie de experimentos.

De manera similar se obtienen resultados repetibles cuando se aumenta la concentración de mercurio manteniendo el régimen de difusión pura con la ventaja de que se obtienen películas más homogéneas como se indicó anteriormente. En la figura 5.9 se presenta el correspondiente perfil comparativo para esta serie de experimentos. En ella se puede observar una muy buena repetibilidad, que concuerda con los resultados obtenidos en el cálculo del número de átomos de mercurio en el TLME.

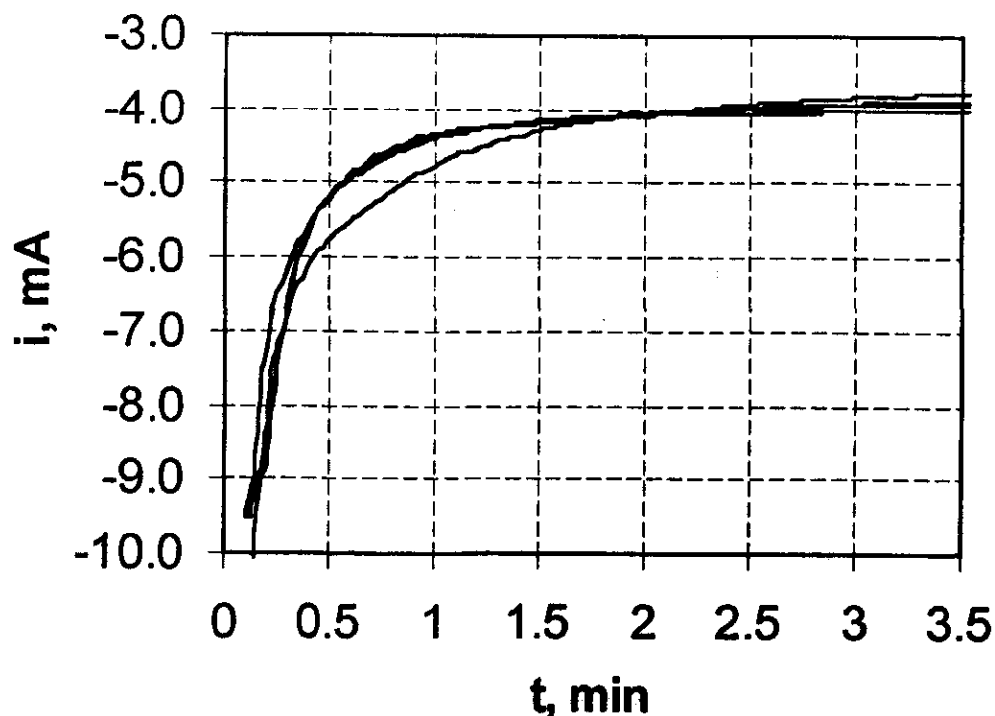


Figura 5.9. Diferentes perfiles cronoamperométricos obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. $[Hg]_T = 0.5 M$, sin agitación. Electrodo de trabajo: disco de oro. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Electrodo auxiliar: acero.

De acuerdo a los resultados anteriores se obtiene una mejor repetibilidad en la formación de la capa de mercurio sobre el electrodo de disco de oro en régimen de difusión pura; sin embargo, se obtienen películas de baja calidad usando bajas concentraciones de mercurio. La propuesta alternativa fue aumentar la concentración de Hg(II)_T a 0.5 M e imponer un régimen de difusión pura. Las nuevas condiciones rindieron excelentes resultados y fue posible obtener una película de mercurio repetible y uniforme adecuada a los propósitos del proyecto.

5.3 Caracterización del Sistema GSH/GSSG y de la Capa del Complejo Hg(GS)_x por Voltamperometría Cíclica.

El estudio por voltamperometría cíclica del sistema glutatión se llevó a cabo utilizando el arreglo de tres electrodos indicado en la sección experimental. En una primera serie de experimentos el electrodo de trabajo (TLME) utilizado fue el formado sobre el electrodo de disco de oro identificado como 1. En la segunda serie de experimentos se utilizó para formar el TLME un electrodo de disco de oro marca Tacussel identificado como electrodo 2.

Los resultados obtenidos con ambos electrodos son prácticamente los mismos.

5.3.1 Dominio electroactivo.

En cada serie de experimentos se obtuvo primero el correspondiente dominio de electroactividad con el medio de reacción utilizado. La figura 5.10 muestra dos voltamperogramas cíclicos del dominio de electroactividad típico obtenidos con el mismo sistema con los electrodos 1 y 2 respectivamente; se puede observar que el intervalo de trabajo se encuentra limpio en ambos casos lo que permite el estudio del sistema glutatión sin interferencias.

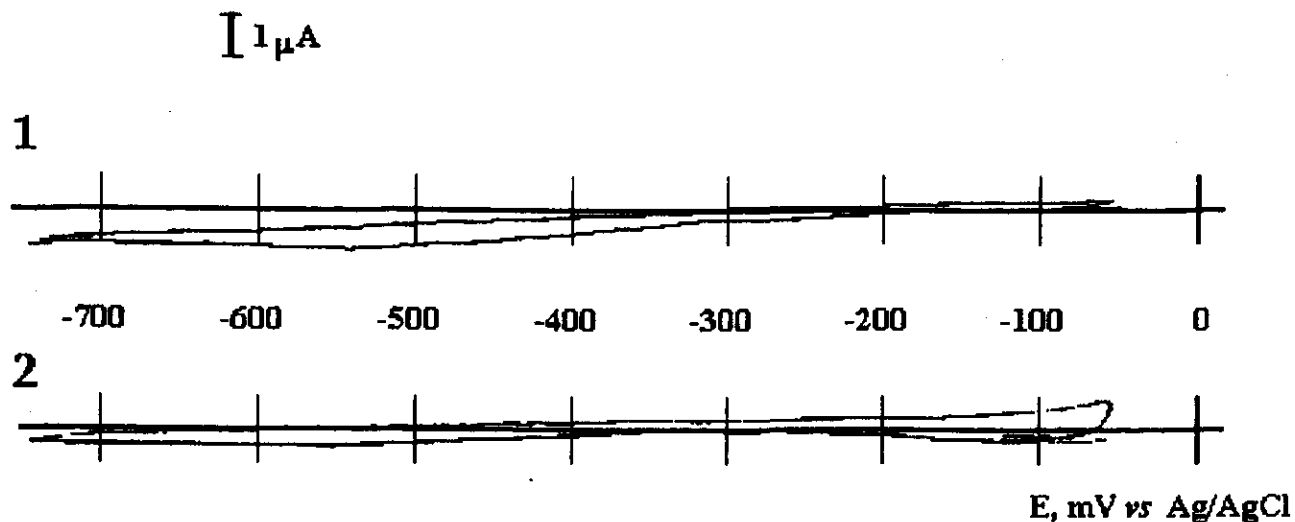
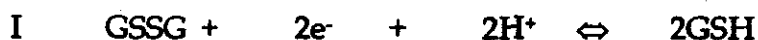


Figura 5.10 Dominio electroactivo. Medio de reacción ftalatos + KNO_3 0.1 M, $\text{pH}=4$. Electrodo de trabajo TLME 1 y 2 respectivamente; electrodo de referencia Ag/AgCl, electrodo auxiliar acero. Velocidad de barrido 500 mV/s. $E_0 = -55$ mV, $E_1 = -750$ mV, $E_2 = -55$ mV.

5.3.2 Estudio de GSH.

Se trazaron los voltamperogramas cíclicos de disoluciones de GSH 10 mM preparadas al momento de realizar el experimento. La figura 5.11 muestra la evolución de un voltamperograma típico obtenido con el electrodo 2 (en el caso del electrodo 1 se observa el mismo comportamiento) en el intervalo de potencial donde el dominio de electroactividad se encuentra libre de interferencias.

Con base en la literatura,⁴⁰ se asignaron los procesos de oxido-reducción a las señales observadas. En -509 mV ocurre una señal de reducción asociada a la siguiente reacción:



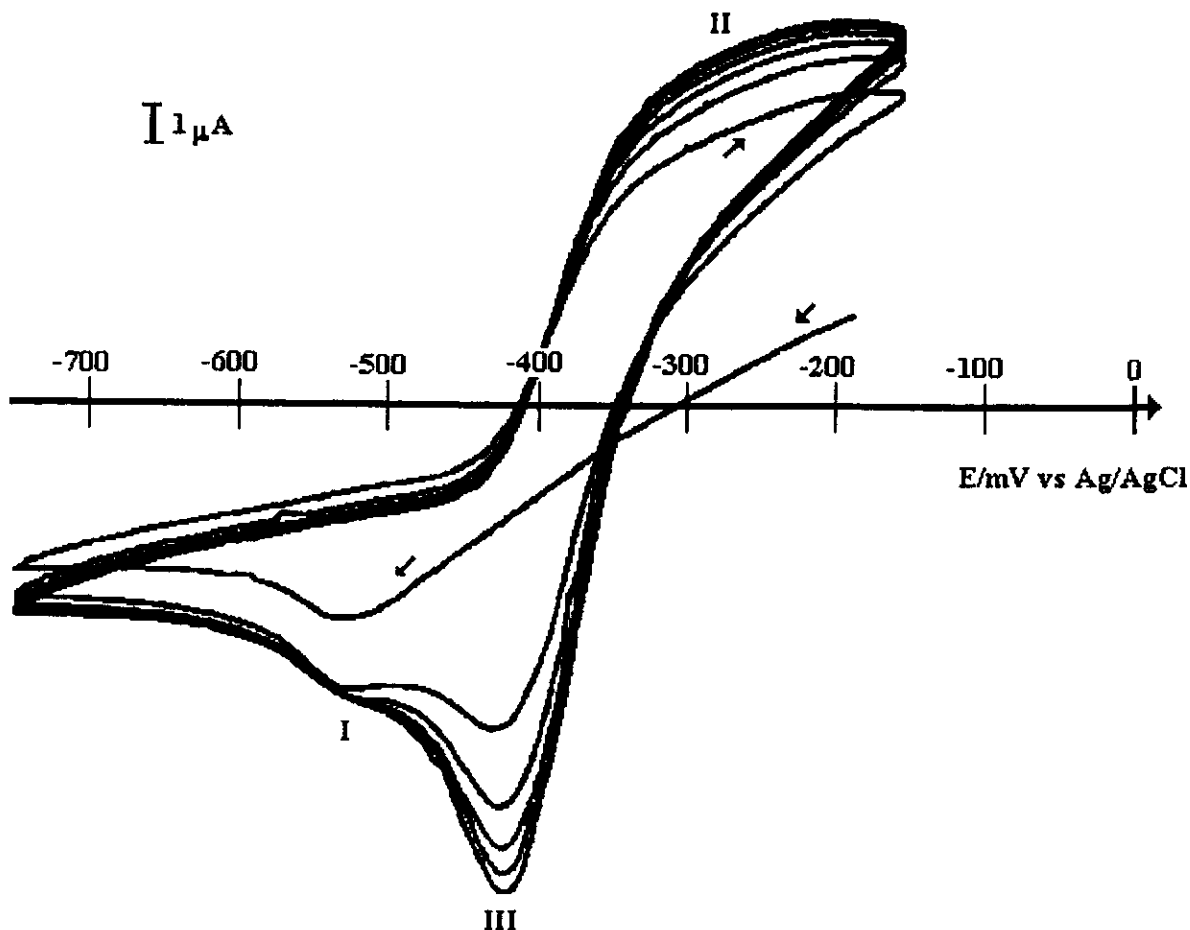


Figura 5.11 Voltamperograma cíclico de GSH 10 mM. Medio de reacción amortiguador de biftalato de potasio + KNO_3 0.1 M, pH = 4. Electrodo de trabajo TLME 2, electrodo de referencia Ag/AgCl, electrodo auxiliar acero. Velocidad de barrido 500 mV/s. $E_0 = -187$ mV, $E_1 = -750$ mV y $E_2 = -150$ mV.

El voltamperograma corresponde a una disolución de GSH, lo cual resulta contradictorio con la señal en -509 mV; sin embargo, es posible que el GSH se encuentre contaminado con a GSSG esto explicaría la primera señal observada en el primer ciclo.

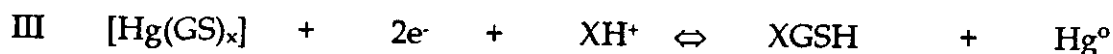
La segunda señal observada en la figura 5.11 no se define adecuadamente y aparece en la región comprendida entre -100 a -300 mV. Esta señal de oxidación se asocia al mercurio al formar un compuesto con el GSH presente:



Donde X=1 o 2.

El compuesto formado aparentemente por un enlace de coordinación entre el mercurio oxidado y el GSH se adsorbe a la superficie del TLME en un proceso que se caracteriza por la forma especial de la señal producida.

Finalmente, en la figura 5.11 en -387 mV se observa la señal de reducción correspondiente a la reacción:



Es importante notar que esta última onda de reducción aparece después del primer ciclo lo cual resulta congruente ya que al inicio no existe el compuesto de coordinación entre el mercurio y el GSH.

Cabe aclarar que la señal de oxidación de GSH para generar GSSG no es observada en el dominio electroactivo de trabajo.

Al comparar los voltamperogramas obtenidos con ambos electrodos 1 y 2 se observó que ocurren las mismas reacciones, ya que las ondas de oxido-reducción aparecen prácticamente en la misma posición; sin embargo, la forma de estas ondas es distinta dependiendo del electrodo de trabajo. Una posible explicación de esta diferencia se puede atribuir a que cada uno de los electrodos posee una película de mercurio formada y distribuida de manera distinta. Esto puede ser ocasionado por tres factores principalmente: en primer lugar la pureza del electrodo de oro, en segundo lugar a la superficie del electrodo de oro ya que no es totalmente homogénea debido a diferencias en el proceso de pulido y en tercer lugar la solubilidad del mercurio en el oro que provoca cambios en las propiedades del TLME.⁸³

5.3.3 Estudio de GSSG

Se obtuvieron varios voltamperogramas cíclicos de disoluciones de GSSG generadas *in situ* partiendo de GSH.

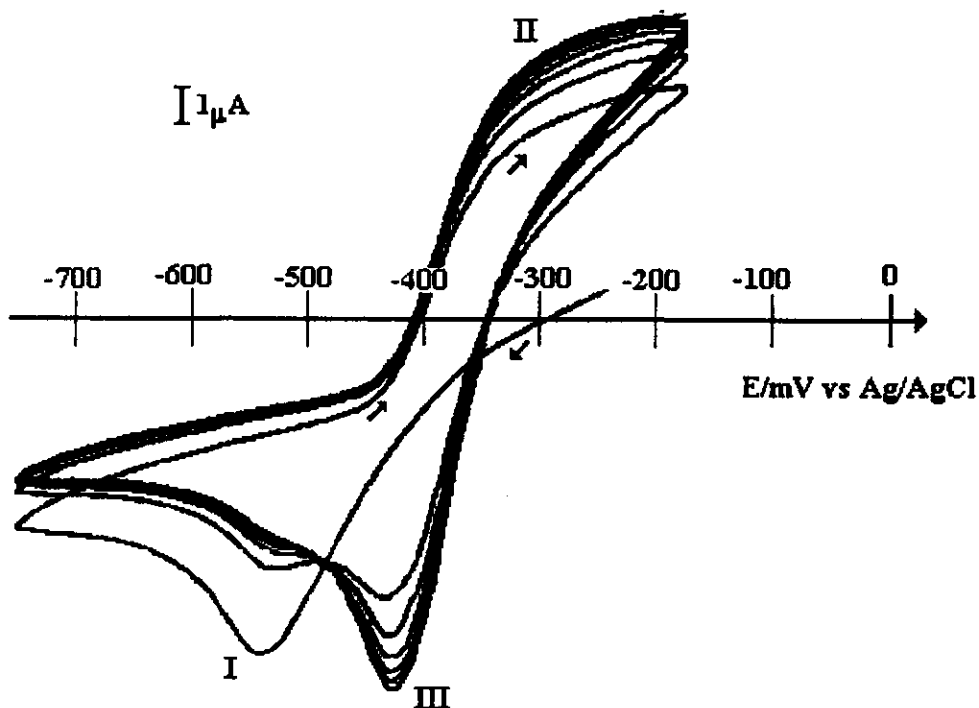


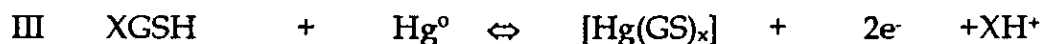
Figura 5.12 Voltamperograma cíclico de GSSG 10 mM. Medio de reacción amortiguador de biftalato de potasio + KNO_3 0.1 M, pH = 4. Electrodo de trabajo TLME 2, electrodo de referencia Ag/AgCl, electrodo auxiliar, acero. Velocidad de barrido 500 mV/s. . $E_0 = -175$ mV, $E_1 = -750$ mV y $E_2 = -175$ mV.

Las señales redox observadas en la figura 5.12 se asocian a los mismos procesos que para el caso de GSH con la diferencia de que la onda de reducción que aparece alrededor de -500 mV (I) es mucho más grande en el primer ciclo, ya que en este caso se parte de GSSG.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

5.3.4 Estudio del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$.

La evolución de los voltamperogramas obtenidos de disoluciones de las especies GSH y GSSG (figuras 5.11-5.12) permiten confirmar la formación de una capa adsorbida al TLME, de acuerdo a una reacción EC(electroquímica/química).



Donde $X=1$ o 2 .

Esta reacción se asocia a la onda de oxidación que aparece en la zona de -300 a -100 mV y su correspondiente onda de reducción alrededor de -380 mV. En las figuras de los voltamperogramas cíclicos se puede observar que ambas ondas muestran un comportamiento similar; es decir, de crecimiento conforme aumenta el número de ciclos, esto conduce a la conclusión de que ocurre un proceso de adsorción en la superficie del electrodo por parte del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado en las condiciones de trabajo. Por otra parte, al realizar el experimento de voltamperometría cíclica del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ se observan las señales asociadas al complejo lo que corrobora la formación de la capa.¹

5.4 Complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$

5.4.1 Enlace Mercurio-Glutatión.

El complejo mercurio-glutatión se forma a través del átomo de azufre del glutatión por un enlace de coordinación, concordando con la teoría de ácidos y bases duros y blandos de Pearson.⁹³

En la literatura se encuentra reportado el pKa del protón del grupo tiol cuyo valor es $\text{pKa} = 9.24$ ($T = 25$ °C).⁸⁵ La formación del enlace de coordinación aunado a la acidez del Hg(II) debilitan el enlace S-H aumentando la acidez de este protón. Por lo que es muy probable que la molécula coordinada al Hg(II) pierda el protón

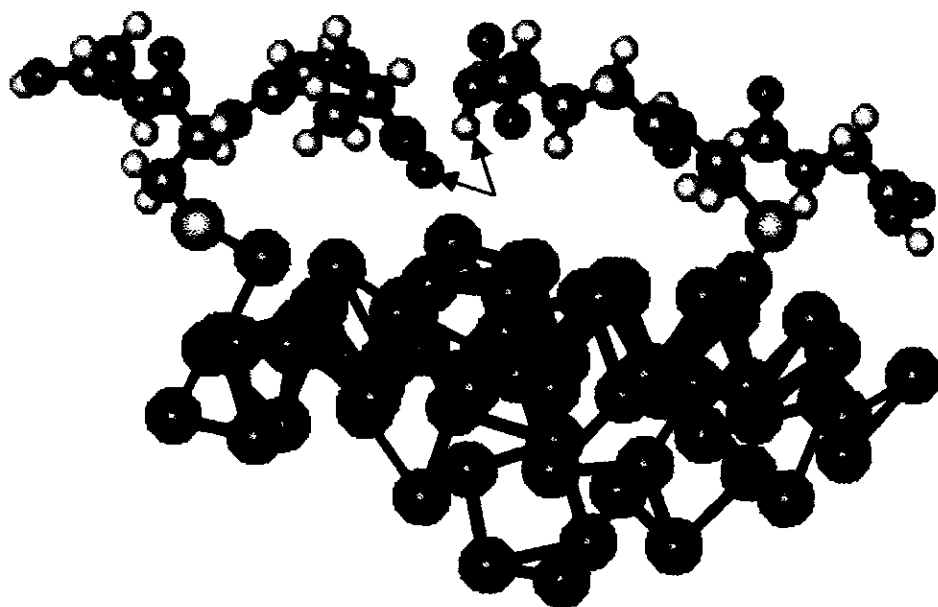
del grupo tiol. Esto además ha sido informado en la literatura en compuestos de coordinación de mercurio(II) con ligantes tiolados como la cisteína.³⁶

5.4.2 Estudio Estérico de la Formación de la Capa del Complejo [Hg(GS)_x].

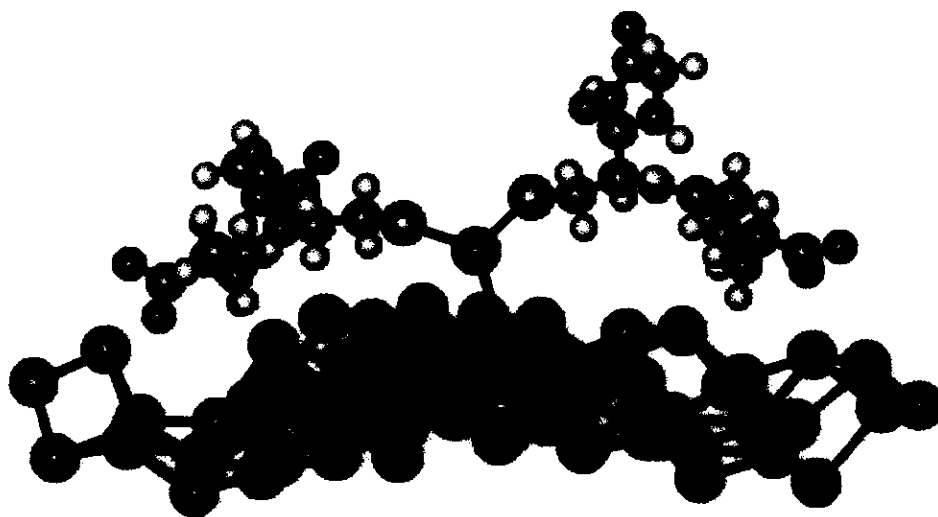
Bard y Stankovich propusieron en 1977 la formación de un complejo entre Hg(II) y dos moléculas de cisteína sin el protón del grupo tiol, el complejo [Hg(RS)₂] se adsorbe sobre la superficie del electrodo formando una película delgada, en este caso se utilizó un electrodo de gota de mercurio.³⁶

Ahora bien, en nuestro caso se propone que debido a factores estéricos puede tratarse de dos complejos diferentes de mercurio, los cuales se adsorben en el TLME, el primero donde se coordine únicamente una molécula de glutatión y el segundo donde se encuentren coordinadas dos. En la figura 5.14 se muestran las dos estructuras probables optimizadas por medio de cálculos de mecánica molecular, en las cuales solamente se consideran factores estéricos. El programa que se utilizó fue Hiperchem y como campo de fuerza MM⁺.

En la figura 5.13a se muestra que la estructura obtenida al coordinarse únicamente una molécula de glutatión con el Hg(II) tiene poco impedimento estérico; por este motivo es más factible que este complejo predomine en la formación de la capa adsorbida en el electrodo. Adicionalmente, un factor de estabilización de la capa formada por el complejo [Hg(GS)]⁺ podría atribuirse a la interacción electrostática entre moléculas adsorbidas en la capa (puentes de hidrógeno). En la figura 5.13a se muestra que una posible interacción entre dos moléculas adyacentes de glutatión formaría un enlace de hidrógeno entre el oxígeno de un carboxilo terminal de una de las moléculas de glutatión y el protón del grupo amino libre de la otra molécula



a)



b)

Figura 5.13 Estructuras de los complejos $[Hg(GS)_x]$, donde $x= 1$ o 2 optimizadas por mecánica molecular en Hiperchem. a) $[Hg(GS)]$ y b) $[Hg(GS)_2]$.

En el caso de la figura 5.13b se observa que al coordinarse dos moléculas de glutatión a un Hg(II) adsorbido en la superficie del electrodo la estructura muestra un mayor impedimento estérico con respecto a 5.13a; sin embargo, esta estructura no es del todo descartable. Por otra parte y al igual que en el caso anterior las interacciones electrostáticas son también posibles. En resumen, es posible que la capa esté formada por cualquiera de uno de estos complejos o por ambos.

5.5 Formación de la Capa del Complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ por Cronoamperometría de Doble Pulso.

5.5.1 Programa de Perturbación.

A partir de soluciones de GSH y GSSG se estudiaron las condiciones experimentales adecuadas para formar la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ sobre el TLME, utilizando cronoamperometría de doble pulso.

El programa de perturbación (figura 5.14) se diseñó considerando los correspondientes voltamperogramas cíclicos.

En el programa de perturbación se tiene como variable el tiempo, τ_1 , que representa el tiempo de enriquecimiento del compuesto precursor del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$, el cual corresponde al tiempo de duración del primer pulso de potencial; mientras que τ_2 es el tiempo necesario para que se lleve a cabo la formación de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$, tiempo de duración del segundo pulso. El compuesto precursor en el sistema en estudio es GSH. En la técnica de cronoamperometría de doble pulso el precursor es formado en el primer pulso, lo que significa que se debe partir de una solución que genere al precursor. El precursor se mantiene cerca de la superficie del electrodo facilitando la formación del complejo deseado. En el sistema estudiado se demostró que independientemente de que la solución utilizada sea GSH o GSSG se genera el

precursor. En este estudio se parte de GSH con el cual se han obtenido buenos resultados.

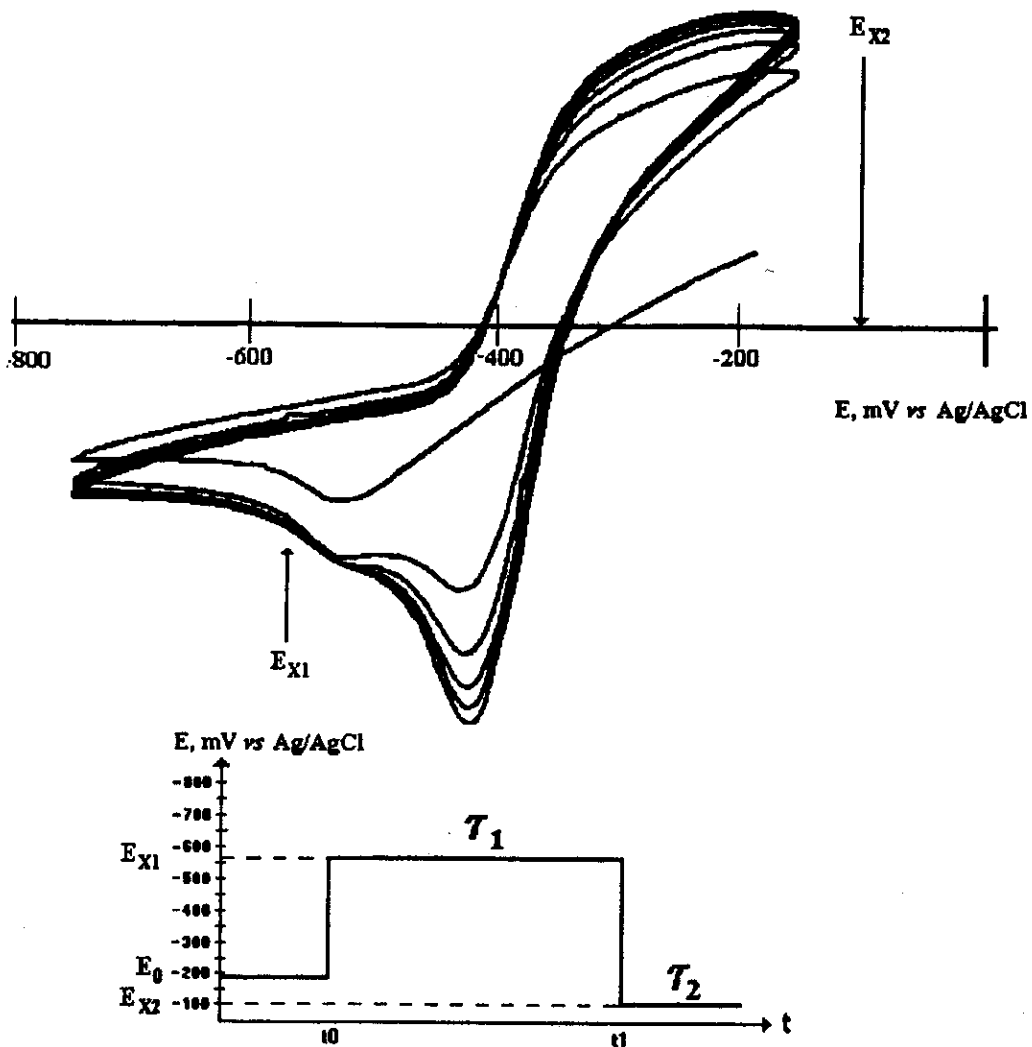


Figura 5.14. Programa de perturbación empleado en el estudio cronoamperométrico. $E_0 = -200$ mV, $E_{X1} = -570$ mV, $E_{X2} = -100$ mV. t_0 = momento en el cual se impone el primer pulso (E_{X1}), t_1 = momento en el cual se impone el segundo pulso (E_{X2})

5.5.2 Cronoamperometría de Doble Pulso.

Se llevaron a cabo varios experimentos cronoamperométricos partiendo de una solución de GSH en las mismas condiciones experimentales utilizadas en voltamperometría cíclica variando el tiempo de enriquecimiento del precursor.

La figura 5.15 presenta un perfil cronoamperométrico de doble pulso típico para una muestra de GSH utilizando el programa de perturbación en el cual se establecieron los siguientes parámetros:

$$E_{X1} = -570 \text{ mV}$$

$$E_{X2} = -100 \text{ mV}$$

$$\tau_1 = 15 \text{ minutos.}$$

$$\tau_2 = 12 \text{ minutos.}$$

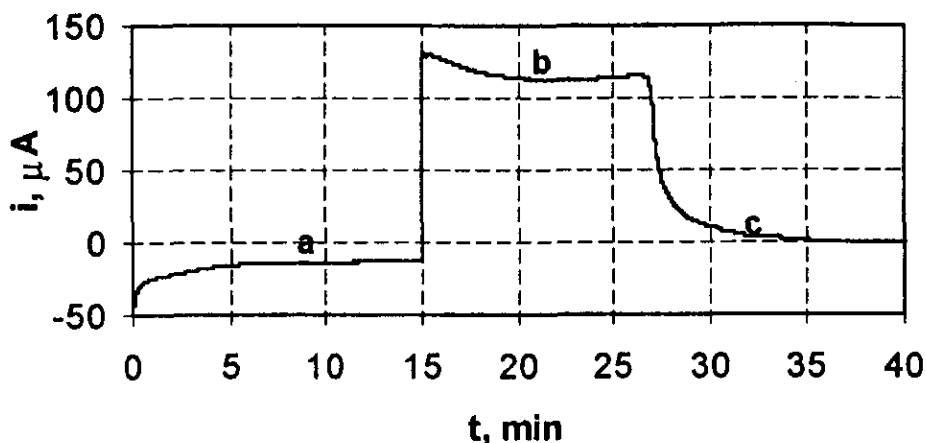


Figura 5.15. Cronoamperometría de doble pulso para una muestra de GSH 10 mM. Zona *a*: enriquecimiento del compuesto precursor, zona *b*: formación de la capa del complejo y zona *c*: pasivación de la superficie del TLME.

En la figura 5.15 se observan tres zonas: la zona *a* corresponde a la acumulación del precursor del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ en la cercanía de la superficie del TLME cuando se impone el potencial de -570 mV . En la zona *b* se lleva a cabo la formación del complejo mercurio-glutatión en la superficie del electrodo. La velocidad de formación de la capa del complejo depende de la acumulación del precursor, es decir al ocurrir una gran acumulación la formación de esta capa se lleva a cabo rápidamente (figura 5.16). Por último, la zona *c* representa la pasivación de la superficie del TLME, es decir, el momento en el cual la capa del complejo cubre totalmente la superficie del TLME provocando el decaimiento de la corriente de forma típica a un proceso controlado por difusión.

La figura 5.16 muestra el efecto de variar el tiempo de enriquecimiento del precursor de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$.

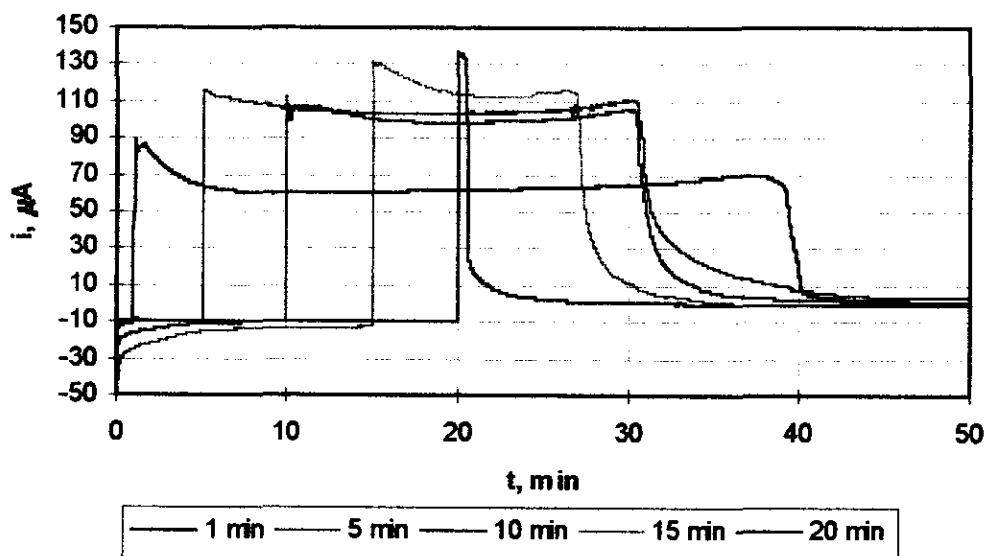


Figura 5.16. Efecto del enriquecimiento del precursor de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$. Electrodo de trabajo: TLME, electrodo de referencia: Ag/AgCl , electrodo auxiliar: acero. $[\text{GSH}] = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 4$.

Como se puede observar a medida que aumenta el tiempo de enriquecimiento del precursor (τ_1) la pasivación y la formación de la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ ocurren en un menor tiempo. En estudios posteriores se encontró que al aumentar τ_1 a valores mayores a 15 minutos se presenta una baja repetibilidad en el tiempo de formación de la capa. Finalmente, el experimento más confiable resultó ser donde $\tau_1 = 15 \text{ min}$. (figura 5.15) bajo esas condiciones la formación de la capa es repetible y adecuada a los objetivos del proyecto.

5.5.3 Cronoamperometría de Doble Pulso Cíclica.

Con el objetivo de poner en evidencia la formación de la capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ se realizaron dos series de experimentos que consistieron en la imposición de programas de perturbación cronoamperométricos cíclicos.

En la primera serie se utilizó un programa de perturbación con las siguientes condiciones:

Ciclo 1: $E_{X1} = -570 \text{ mV}$; $E_{X2} = -100 \text{ mV}$; $\tau_1 = 15 \text{ min.}$; $\tau_2 = 3 \text{ min.}$ (no se ha pasivado totalmente el electrodo). Ciclo 2: $E_{X1} = -570 \text{ mV}$; $E_{X2} = -100 \text{ mV}$; $\tau_1 = 15 \text{ min.}$; $\tau_2 = 7 \text{ min.}$ (pasivación total del electrodo).

La figura 5.17 representa el perfil cronoamperométrico obtenido en las condiciones anteriormente descritas. Se observa en este caso que en el primer ciclo se impide la pasivación total de la superficie del TLME; es decir, aún hay espacio para que continúe la formación de la capa en la superficie. En el segundo ciclo ocurre nuevamente un enriquecimiento del precursor y la posterior formación rápida de la capa llegando por último a la pasivación total de la superficie del TLME.

En la segunda serie se utilizan las siguientes condiciones:

Ciclo 1: $E_{X1} = -570 \text{ mV}$; $E_{X2} = -100 \text{ mV}$; $\tau_1 = 15 \text{ min.}$; $\tau_2 = 12 \text{ min.}$ (pasivación total del TLME). Ciclo 2: $E_{X1} = -570 \text{ mV}$; $E_{X2} = -100 \text{ mV}$; $\tau_1 = 15 \text{ min.}$; $\tau_2 = 10 \text{ min.}$

En la figura 5.18 se presenta el perfil cronoamperométrico obtenido bajo las condiciones anteriores. En el primer ciclo se llega a la pasivación total de la superficie del TLME por lo que en el segundo ciclo no ocurre enriquecimiento ni la formación de la capa.

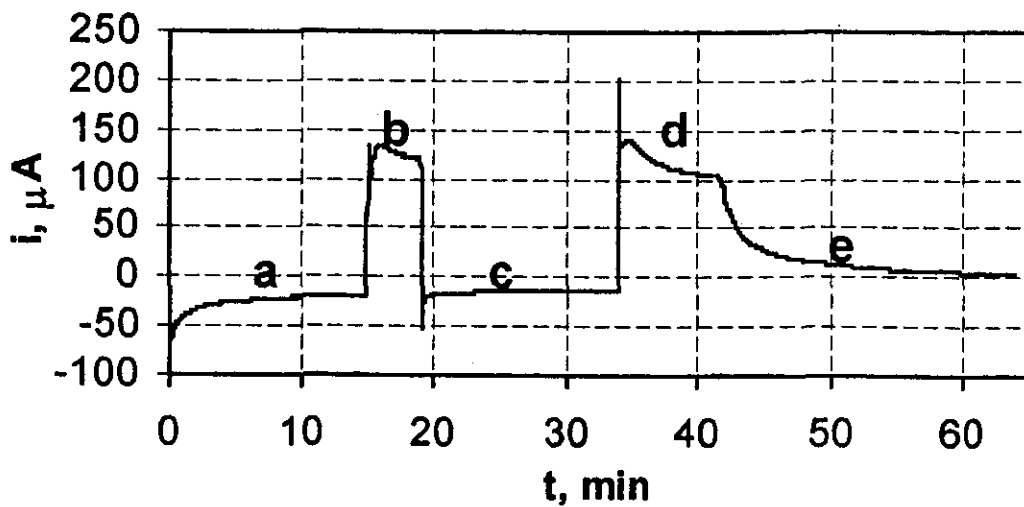


Figura 5.17 Cronoamperometría de doble pulso con dos ciclos. Zona *a*: enriquecimiento del precursor; zona *b*: formación de la capa; zona *c*: reenriquecimiento del precursor; zona *d*: término de la formación de la capa y zona *e*: pasivación total de la superficie.

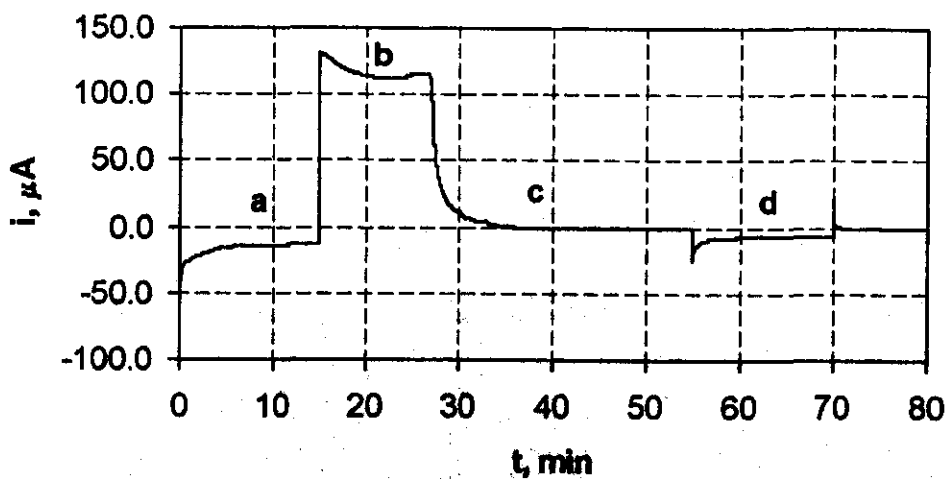


Figura 5.18 Cronoamperometría de doble pulso cíclica. Zona *a*: enriquecimiento del precursor; zona *b*: formación de la capa; zona *c*: pasivación total de la superficie y zona *d*: aplicación del segundo ciclo.

Con base en estos experimentos se establece que bajo las condiciones de trabajo se logra la obtención de una capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ con las características adecuadas para su utilización como electrodo selectivo.

5.6 Relaciones de Nikolsky, $[E]_{t=0} = F(\text{Log}c)$, para el Electrodo de Capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$.

5.6.1 Caso de GSH como analito.

Esta serie de experimentos se diseñó para comprobar que el electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ tiene una respuesta proporcional a la concentración de la molécula de GSH. Por lo que se realizaron curvas de calibración con los electrodos de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ depositados sobre el TLME 1 y 2 respectivamente.

Cada tres curvas de calibración es necesario regenerar la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ para evitar posibles errores debido al desgaste de la capa (desorción de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$).

Los resultados experimentales se encuentran en el Anexo I (tablas AI.1 y AI.2)

5.6.1.1 Resultados obtenidos con el electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre TLME 1.

El potencial de equilibrio se determinó utilizando un sistema de tres electrodos con los electrodos de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ 1 y 2 respectivamente como electrodos de trabajo para cada uno de los estándares.

En la figura 5.19 se representa la curva de calibración obtenida con el electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ 1. Esta curva se obtiene con los promedios de los potenciales para diferentes series experimentos (anexo II). Los potenciales medidos fueron: inicial (E_i), al equilibrio sin agitación (E_{ii}) y con agitación al equilibrio (E_{iii}). En la figura 5.19 se representa únicamente E_{ii} ya que esa lectura resultó ser la más

precisa, las curvas de calibración correspondientes a E_I y E_{III} se muestran en el anexo III y el análisis estadístico se presenta en el anexo II.

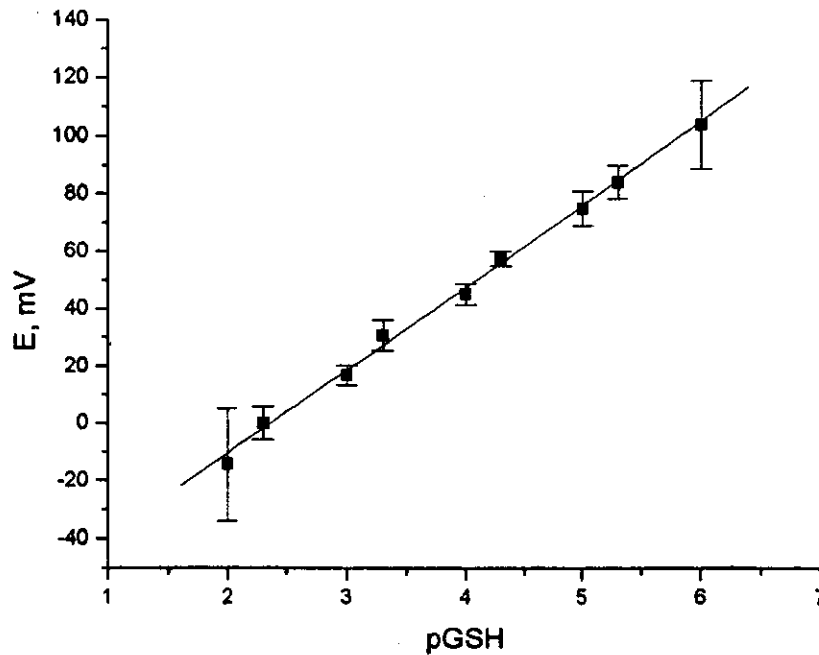


Figura 5.19 Curva de calibración ponderada para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 1

En la tabla 5.5 se muestran los valores estadísticos de las regresiones lineales ponderadas de las curvas de calibración que siguen la ecuación de Nikolsky⁷⁷ ($E_i = f(\log C)$):

$$E_i = b + m \cdot \text{pGSH}$$

donde b y m son constantes, en este caso expresadas en mV.

Tabla 5.5. Análisis estadístico de la ecuación Nikolsky para el electrodo *I* analito GSH.

Electrodo	<i>I</i>		
	E _I	E _{II}	E _{III}
<i>m</i>	28.77	28.92	28.65
<i>b</i>	-77.31	-68.17	-76.13
<i>r</i> ²	0.985	0.994	0.986

De donde se pueden expresar las siguientes ecuaciones:

$$E_I = -77.31 + 28.777 \cdot p\text{GSH}$$

$$E_{II} = -68.17 + 28.92 \cdot p\text{GSH}$$

$$E_{III} = -76.13 + 28.65 \cdot p\text{GSH}$$

A partir de los datos anteriores y el análisis estadístico completo (residuales y límites de confianza) se observa que con la lectura E_{II} la recta presenta un mejor comportamiento lineal y una menor desviación estándar; esto conlleva a una mayor repetibilidad en las lecturas de potencial (Ver anexo III). Por lo que se recomienda utilizar este valor en la determinación de la concentración de GSH cuando se utilice este sistema.

A pesar de que se obtiene una buena repetibilidad es necesario resaltar la importancia de realizar una curva de calibración al momento de tomar las lecturas para comprobar la linealidad de la respuesta del electrodo en función de la concentración. Se ha observado durante la experimentación que los valores de potencial varían con el uso del electrodo (Anexo III, figura AIII.3) debido al desgaste de la capa de complejo [Hg(GS)_x]. A partir de la quinta curva de calibración obtenida con la misma capa de [Hg(GS)_x] se observa pérdida de la linealidad.

5.6.1.2 Resultados obtenidos con el electrodo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre TLME 2.

Las curvas de calibración con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 2 (anexo III) presentan también un comportamiento lineal. Los datos de las regresiones lineales ponderadas de la ecuación de Nikolsky se presentan en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Análisis estadístico de la ecuación Nikolsky para el electrodo 2, analito GSH.

Electrodo	2		
Potencial	E_I	E_{II}	E_{III}
m	73.11	72.64	73.27
b	-401.66	-386.50	-393.88
r^2	0.995	0.996	0.996

Los cuales dan como resultado las siguientes ecuaciones:

$$E_I = -401.66 + 73.11 \cdot pGSH$$

$$E_{II} = -386.50 + 72.64 \cdot pGSH$$

$$E_{III} = -393.88 + 73.27 \cdot pGSH$$

De la misma manera que para el electrodo sobre TLME 1 el potencial E_{II} presenta una mejor linealidad y repetibilidad (la justificación se presenta en el anexo III). Su curva de calibración se presenta en la figura 5.20. Se observa que la desviación estándar es menor que en el caso del electrodo de capa 1, por lo cual el electrodo de capa 2 resulta más confiable.

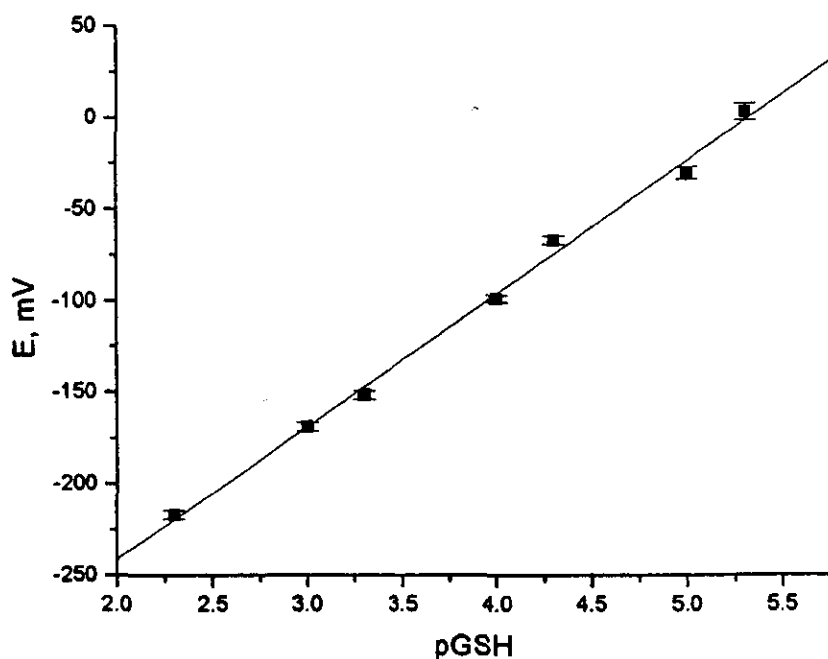


Figura 5.20 Curva de calibración ponderada E_{II} para estándares de GSH obtenidas con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 2

De la misma forma se observó que los valores de potencial varían con el uso del electrodo. El desgaste de la capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre TLME 2 se lleva a cabo más lentamente, ya que no se observó la pérdida de linealidad al menos en 8 curvas de calibración realizadas consecutivamente con la misma capa de $[Hg(GS)_x]$. Esta diferencia puede relacionarse con el tamaño del electrodo para: TLME 1 el área es igual a 0.0314 cm^2 mientras que para TLME 2 es de 0.0078 cm^2 . Esto podría significar que a menor área se tiene una mayor estabilidad de la capa.

5.6.2 Caso de GSSG como analito.

Esta serie de experimentos se diseñó para determinar la respuesta del electrodo de capa de $[Hg(GS)_x]$ a la concentración de la molécula de GSSG.

Se realizaron curvas de calibración a partir de 5 series de estándares de

GSSG a los cuales se les determinó el potencial de equilibrio utilizando un sistema de tres electrodos con el electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$. De la misma manera que para GSH cada tres curvas de calibración se regenera la capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$. Los resultados experimentales se encuentran en el anexo I (tablas AI.3).

Los datos de regresión lineal de las curvas de calibración se presentan en la tabla 5.7, donde se observa que no existe linealidad en la respuesta del electrodo en función de la concentración de GSSG, además es importante resaltar que las desviaciones estándar en las lecturas son muy grandes (anexo II). Sin embargo, si es posible registrar una lectura de potencial debida a GSSG. (anexo III)

Por lo anterior se observa que el electrodo de capa del complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre TLME no es selectivo a GSSG en las condiciones de trabajo establecidas.

Tabla 5.7. Análisis estadístico de la ecuación Nikolsky para el electrodo 1, analito GSSG.

Electrodo	1		
	E_I	E_{II}	E_{III}
m	10.86	5.79	9.30
b	-25.23	-2.31	-13.97
r^2	0.783	0.847	0.943

5.7 Coeficiente de Selectividad para el Sistema GSH/GSSG con el Electrodo de Capa del Complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$.

El método⁹⁴ utilizado consistió en efectuar una serie de mediciones de la

molécula primaria GSH (molécula de interés) a varias concentraciones, manteniendo a la molécula interferente GSSG a una concentración constante. Se construyó una curva con las lecturas de potencial (E_{II}) en función de la concentración de GSH.

Interferente GSSG, pGSSG=3.

En primer lugar, se utilizó como interferente GSSG en una concentración de 10^{-3} M. En la figura 5.21 se observa que no existe tendencia en las lecturas obtenidas. Esto se debe a que la concentración del interferente es muy alta.

Por lo que para lograr obtener la coeficiente de selectividad es necesario disminuir la concentración del interferente.

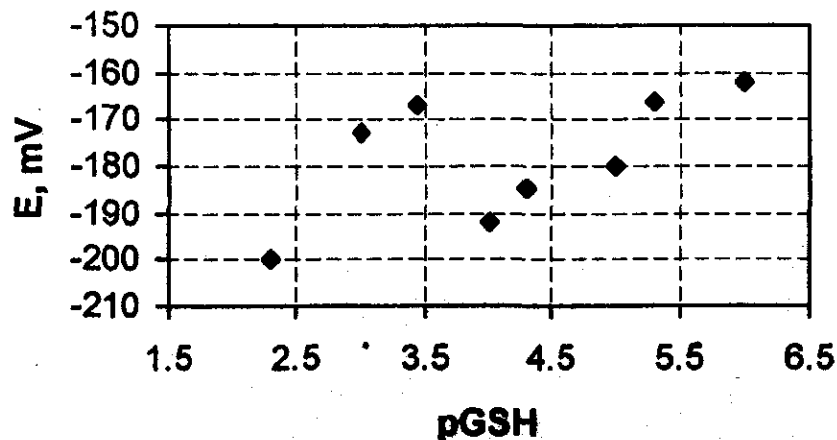


Figura 5.21 Determinación de $k_{por}^{GSH, GSSG}$ a partir de una serie de mediciones del E_{II} (promedio) de estándares de GSH a pGSSG=3 con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 2.

Interferente GSSG, pGSSG=4.

Se utilizó como interferente GSSG en una concentración de 10^{-4} M y se construyó una gráfica de E_{II} en función de pGSH. En la figura 5.22 se presenta la gráfica en donde se observa que los datos forman dos segmentos lineales; uno en el que el electrodo responde a la molécula GSH, caracterizado por una pendiente de alrededor de 0.0592 V y un segmento horizontal en el cual el electrodo responde realmente a la actividad del interferente (GSSG).

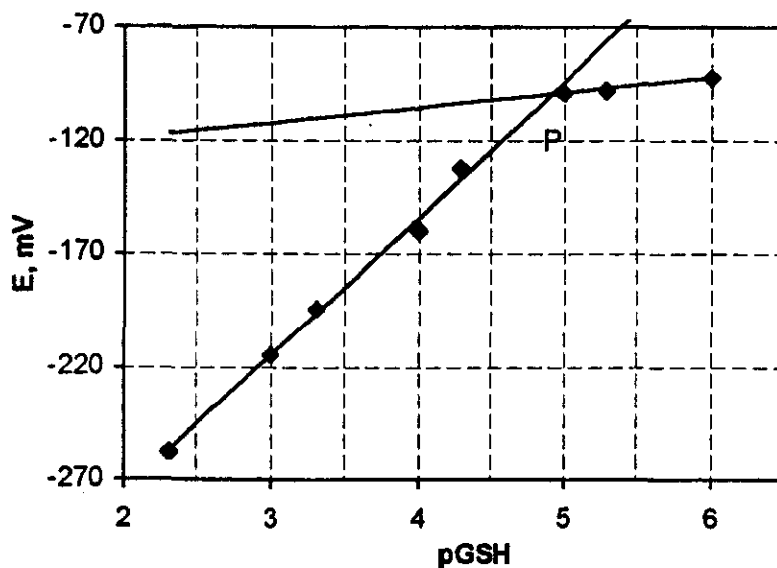


Figura 5.23 Determinación de $k_{pot}^{GSH,GSSG}$ a partir de una serie de mediciones del E_{II} (promedio) de estándares de GSH a pGSSG=4 con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 2.

El cálculo del coeficiente de selectividad se basó en la siguiente ecuación:

$$a_{GSH} = k_{pot}^{GSH,GSSG} (a_{GSSG})$$

El procedimiento consistió en calcular el punto P , el cual es la relación a_{GSH}/a_{GSSG} . P se obtiene de la intersección de los dos segmentos de la gráfica al igualar las ecuaciones que describen cada una de las rectas.

La recta de respuesta al GSH se describe por la siguiente ecuación:

$$E = -396.18(\text{mV}) + 60.422(\text{mV}) \cdot \text{pGSH}, \quad r^2 = 0.994$$

La recta que responde al interferente GSSG está descrita por la ecuación:

$$E = -132.27(\text{mV}) + 6.614(\text{mV}) \cdot \text{pGSH}, \quad r^2 = 0.9945$$

A partir de estas ecuaciones se obtiene el coeficiente de selectividad:

$$k_{pot}^{GSH, GSSG} = 0.1246$$

En resumen, la ecuación de Nikolsky y el coeficiente de selectividad obtenidos describen la eficiencia del electrodo. Para este caso la eficiencia es buena a bajas concentraciones de este interferente (menores a 10^{-4} M).

5.8 Tiempo de Estabilización de la Respuesta del Electrodo de Capa de Complejo [Hg(GS)_x].

La determinación del tiempo de espera antes de tomar la lectura (tiempo de respuesta) de potencial es un factor clave tanto en los estudios realizados para determinar la ecuación de Nikolsky como para la obtención del coeficiente de selectividad. Un tiempo adecuado permite obtener resultados repetibles a consecuencia de que la lectura es tomada en el equilibrio. En la figura 5.23 se muestra la tendencia del potencial en función del tiempo, se observa que el potencial de equilibrio se alcanza en aproximadamente 4 minutos por lo que a partir de este tiempo puede tomarse una lectura confiable.

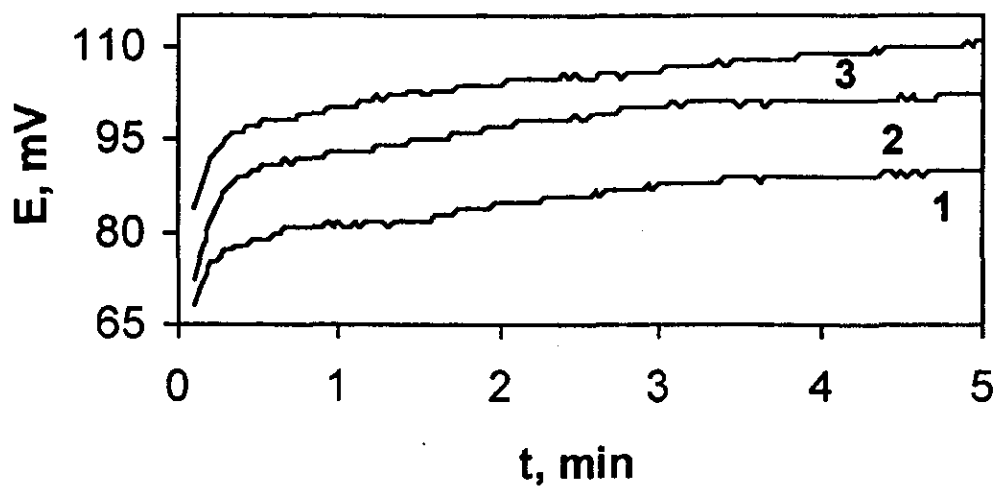


Figura 5.23 Tiempo de estabilización de la respuesta del electrodo de capa de complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$, a diferentes concentraciones de GSH. La línea 1 corresponde a $\text{pGSH} = 4.3$; línea 2 $\text{pGSH} = 5.0$ y línea 3 $\text{pGSH} = 5.3$.

6. CONCLUSIONES.

- La preparación de la superficie, la concentración total de Hg^{2+} y el régimen utilizado son los factores claves en la obtención del TLME con las características necesarias para la formación de un electrodo selectivo.
- Se obtuvo un electrodo selectivo conformado por una capa de complejo $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ homogénea y repetible a partir de experimentos de cronoamperometría de doble pulso.
- El electrodo obtenido presentó selectividad a la forma reducida del glutatión.

ANEXO I. TABLAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

Determinación de la ecuación de Nikolsky.

En la tabla AI.1 se presentan los resultados obtenidos para diferentes curvas de calibración (series de estándares) utilizando el electrodo selectivo a GSH de capa del complejo $[Hg(GS)_x]$ construido sobre el TLME 1.

Tabla AI.1 Resultados electrodo construido sobre TLME 1 para GSH.

SERIE	I			II			III			IV			V		
	pGSH	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}
2	13	0	0	-10	4	10	0	-44	45	27	12	0	0	-5	-32
2.3	-2	5	0	5	8	12	6	6	-13	3	6	6	-1	5	-32
3	15	20	10	18	22	25	10	21	4	7	19	16	8	18	0
3.3	26	35	12	24	36	30.8	24	33	13	21	37	22	45	36	29
4	40	50	60	32	47	38	25	49	23	31	50	36	66	44	50
4.3	47	58	65	38	56	38	56	55	70	43	57	50	70	53	62
5	65	73	98	50	67	46	73	70	83	66	69	61	78	66	93
5.3	72	80	100	57	75	48	90	81	92	78	77	88	100	79	105
6	80	82	103	62	86	66	96	125	103	92	105	90	102	123	100

Tabla AI.1 Continuación resultados electrodo construido sobre TLME 1 para GSH.

SERIE	VI			VII			VIII			IX		
	pGSH	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}
2	-25	-31	-42	-18	-38	-25	0	0	-6	0	-25	-21
2.3	0	4	-35	-15	-5	-15	-16	-7	-3	-15	-3	-13
3	15	18	11	-8	11	5	17	12	0	-3	18	10
3.3	10	38	6	-6	24	7	22	23	15	15	28	16
4	24	50	22	0	42	35	26	40	46	21	43	24
4.3	51	61	37	68	55	65	46	57	60	39	61	31
5	72	73	42	73	83	70	59	78	67	50	80	43
5.3	83	82	51	83	90	91	72	87	69	97	88	59
6	92	127	90	92	106	101	85	105	101	101	91	69

* E_i = lectura de potencial inicial, E_{ii} = lectura del potencial al equilibrio (sin agitación), E_{iii} = lectura del potencial al equilibrio (con agitación).

Tabla AI.1 Continuación resultados electrodo construido sobre TLME 1 para GSH.

SERIE	X			XI			XII			XIII		
	pGSH	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}
2	-33	-33	-42	-47	-31	-42	-1	6	-7	-28	-2	-17
2.3	-20	-8	0	-22	-3	-1	-18	-6	-2	-19	-3	-2
3	0	15	2	-13	16	7	12	13	11	3	16	-14
3.3	22	25	-5	15	29	31	24	29	10	21	26	18
4	35	41	30	45	42	49	50	44	45	32	45	39
4.3	40	57	49	51	60	69	59	59	50	49	61	55
5	67	76	72	79	82	82	87	82	72	57	79	92
5.3	90	87	90	93	90	100	90	94	78	65	87	90
6	93	90	90	98	115	100	91	95	83	70	100	93

En la tabla AI.2 se presentan los resultados obtenidos para diferentes curvas de calibración (series de estándares) utilizando el electrodo selectivo a GSH de capa del complejo $[Hg(GS)_x]$ construido sobre el TLME 2.

Tabla AI.2 Resultados electrodo construido sobre TLME 2 para GSH.

SERIE	I			II			III			IV			
	pGSH	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}
2	-230	-215	-218										
2.3	-232	-219	-222	-225	-216	-220	-225	-213	-204	-210	-215	-218	
3	-200	-171	-176	-180	-168	-173	-180	-172	-180	-185	-168	-175	
3.3	-187	-149	-155	-166	-151	-149	-169	-153	-159	-155	-148	-148	
4	-140	-99	-96	-137	-103	-108	-101	-98	-97	-110	-97	-100	
4.3	-100	-64	-60	-100	-70	-80	-66	-66	-73	-76	-66	-58	
5	-43	-35	-35	-35	-26	-33	-41	-32	-34	-28	-30	-29	
5.3	-31	-5	-12	-8	7	0	-5	8	5	-10	2	6	

*E_I = lectura de potencial inicial, E_{II} = lectura del potencial al equilibrio (sin agitación), E_{III} = lectura del potencial al equilibrio (con agitación).

Tabla AI.2 Continuación resultados electrodo construido sobre TLME 2 para GSH.

SERIE	I			II			III		
	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}
2.3	-223	-218	-220	-240	-219	-215	-230	-218	-225
3	-178	-170	-181	-205	-167	-174	-198	-165	-180
3.3	-160	-153	-155	-194	-150	-150	-167	-155	-155
4	-113	-97	-97	-150	-99	-98	-102	-98	-98
4.3	-60	-69	-65	-87	-64	-60	-68	-68	-66
5	-35	-33	-30	-31	-28	-25	-40	-28	-30
5.3	0	0	-1	-10	5	10	-15	4	5

En la tabla AI.3 se presentan los resultados obtenidos para diferentes curvas de calibración (series de estándares) utilizando el electrodo selectivo a GSSG de capa del complejo $[Hg(GS)_x]$ construido sobre el TLME 1.

Tabla AI.3 Resultados electrodo construido sobre TLME 1 para GSSG.

SERIE	I			II			III			IV			V		
	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}
1	-8	-28	-12	-12	-7	-17	0	16	0	11	10	-9	-25	0	-5
2	15	-6	6	-2	-10	9	-13	0	10	-5	13	23	23	23	3
3	-9	-1	6	-26	12	4	-22	36	30	-1	26	17	1	25	9
4	0	35	9	41	9	18	40	22	43	38	52	35	30	40	19
5	15	31	31	21	31	38	15	20	41	32	34	40	40	26	28
6	30	37	41	55	32	35	45	25	42	42	33	37	56	26	21

*E_I = lectura de potencial inicial, E_{II} = lectura del potencial al equilibrio (sin agitación), E_{III} = lectura del potencial al equilibrio (con agitación).

Determinación del coeficiente de Selectividad.

En la tabla AI.4 se presentan los resultados obtenidos para diferentes curvas de calibración (series de estándares) utilizando el electrodo selectivo a GSH de capa del complejo $[Hg(GS)_x]$ construido sobre el TLME 2. Se utilizó como interferente GSSG a pGSSG = 3.0.

Tabla AI.4 Resultados electrodo construido sobre TLME 2 para GSH, determinación de la constante de selectividad $pGSSG = 3.0$.

SERIE	I			II			III			IV		
	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}
2.3	-210	-200	-198	-215	-199	-195	-205	-202	-200	-212	-198	-200
3	-200	-168	-170	-162	-170	-172	-197	-173	-170	-198	-180	-184
3.44	-183	-161	-160	-124	-165	-161	-155	-165	-169	-175	-176	-174
4	-174	-190	-189	-246	-197	-196	-180	-190	-187	-179	-190	-192
4.3	-189	-187	-185	-177	-184	-187	-171	-181	-185	-165	-187	-185
5	-168	-183	-183	-164	-179	-180	-170	-175	-171	-158	-182	-180
5.3	-180	-170	-175	-156	-160	-160	-163	-163	-163	-150	-171	-174
6	-163	-165	-166	-150	-157	-155	-157	-158	-155	-157	-168	-173

En la tabla AI.5 se presentan los resultados obtenidos para diferentes curvas de calibración (series de estándares) utilizando el electrodo selectivo a GSH de capa del complejo $[Hg(GS)_x]$ construido sobre el TLME 2. Se utilizó como interferente GSSG a $pGSSG = 4.0$.

Tabla AI.5 Resultados electrodo construido sobre TLME 2 para GSH, determinación de la constante de selectividad $pGSSG = 4.0$.

SERIE	I			II			III			IV		
	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}
2.3	-180	-257	-258	-215	-257	-159	-353	-259	-255	-250	-258	-256
3	-206	-213	-210	-162	-214	-210	-219	-214	-207	-200	-216	-210
3.44	-192	-195	-190	-124	-194	-198	-158	-196	-198	-162	-194	-194
4	-189	-162	-165	-246	-160	-157	-161	-161	-169	-129	-159	-165
4.3	-197	-132	-18	-177	-133	-133	-138	-132	-135	-115	-133	-130
5	-184	-100	-100	-164	-100	-101	-143	-98	-100	-109	-98	-100
5.3	-195	-95	-93	-156	-96	-99	-134	-100	-103	-110	-99	-96
6	-196	-89	-90	-150	-95	-93	-114	-94	-95	-107	-92	-96

* E_I = lectura de potencial inicial, E_{II} = lectura del potencial al equilibrio (sin agitación), E_{III} = lectura del potencial al equilibrio (con agitación).

ANEXO II. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Se realizó el tratamiento estadístico descriptivo de los datos experimentales por medio del programa computacional EXCEL 97 y ORIGIN 4.0 obteniéndose los parámetros de media y de desviación estándar.

Determinación de la ecuación de Nikolsky.

Tabla AII.1 Análisis estadístico de los resultados del electrodo construido sobre TLME 1 para GSH.

pGSH	Media			Desv. Est.		
	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}
2	-9.3846	-14.385	-13.769	20.1765	19.4745	24.8601
2.3	-8.7692	-0.0769	-7.5385	10.6078	5.79456	13.7575
3	6.23077	16.8462	6.69231	9.85862	3.41189	9.26809
3.3	20.2308	30.6923	15.7538	11.3443	5.36011	10.5525
4	32.8462	45.1538	38.2308	15.8316	3.64797	11.6057
4.3	50.5385	57.6923	53.9231	10.3249	2.59437	12.7636
5	67.3846	75.2308	70.8462	11.2067	5.96034	18.9026
5.3	82.3077	84.3846	81.6154	12.8866	5.75237	19.0418
6	88.7692	103.846	91.4615	11.8192	15.0767	12.3397

Tabla AII.2 Análisis estadístico de los resultados del electrodo construido sobre TLME 2 para GSH.

pGSH	Media			Desv. Est.		
	E_i	E_{ii}	E_{iii}	E_i	E_{ii}	E_{iii}
2.3	-226.43	-216.66	-217.71	9.25306	2.26779	6.79986
3	-189.43	-168.71	-177	11.2229	2.42997	3.26599
3.3	-171.14	-151.29	-153	14.1825	2.49762	4.04145
4	-121.86	-98.714	-99.143	19.9952	2.05888	4.09894
4.3	-79.571	-66.714	-66	16.3489	2.36039	7.97914
5	-36.143	-30.286	-30.857	5.49025	3.1997	3.4365
5.3	-11.286	3	1.95714	9.80094	4.47214	7.15142

* E_i = lectura de potencial inicial, E_{ii} = lectura del potencial al equilibrio (sin agitación), E_{iii} = lectura del potencial al equilibrio (con agitación).

Tabla AII.3 Análisis estadístico de los resultados del electrodo construido sobre TLME 1 para GSSG.

pGSH	Media			Desv. Est.		
	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}
1	-6.8	-1.8	-8.6	13.4425	17.1231	6.50385
2	3.6	4	10.2	14.893	13.7295	7.66159
3	-11.4	19.6	13.2	12.1778	14.3283	10.616
4	29.8	31.6	24.8	17.2105	16.5922	13.8275
5	24.6	28.4	35.6	11.0589	5.50454	5.77062
6	45.6	30.6	35.2	10.6442	5.02991	8.43801

Determinación del coeficiente de Selectividad.

Tabla AII.4 Análisis estadístico de los resultados del electrodo construido sobre TLME 2 para GSH, determinación de la constante de selectividad pGSSG = 3.0.

pGSH	Media			Desv. Est.		
	E _I	E _{II}	E _{III}	E _I	E _{II}	E _{III}
2.3	-210.5	-199.75	-198.25	4.20317	1.70783	2.36291
3	-189.25	-172.75	-174	18.2094	5.25198	6.733
3.44	-159.25	-166.75	-166	26.2853	6.44851	6.68331
4	-194.75	-191.75	-191	34.2673	3.5	3.91578
4.3	-175.5	-184.75	-185.5	10.247	2.87228	1
5	-165	-179.75	-178.5	5.2915	3.59398	5.19615
5.3	-162.25	-166	-166	12.9711	5.35413	7.61577
6	-156.75	-162	-162.25	5.31507	5.35413	8.8459

*E_I = lectura de potencial inicial, E_{II} = lectura del potencial al equilibrio(sin agitación), E_{III} = lectura del potencial al equilibrio(con agitación).

Tabla AII.5 Análisis estadístico de los resultados del electrodo construido sobre TLME 2 para GSH, determinación de la constante de selectividad $pGSSG = 4.0$.

pGSH	Media			Desv. Est.		
	E_I	E_{II}	E_{III}	E_I	E_{II}	E_{III}
2.3	-249.5	-257.75	-232	91.4677	1.1547	56.3116
3	-196.75	-214.25	-209.25	29.8719	0.57735	1.73205
3.3	-159	-194.75	-195	34	1	4.6188
4	-181.25	-160.5	-164	43.3167	1	6.1101
4.3	-156.75	-132.5	-104	30.0056	0.57735	66.9801
5	-150	-99	-100.25	20.502	1.1547	0.57735
5.3	-148.75	-97.5	-97.75	30.8923	2.38048	5.03322
6	-141.75	-92.5	-93.25	41.1015	2.64575	2.51661

* E_I = lectura de potencial inicial, E_{II} = lectura del potencial al equilibrio(sin agitación), E_{III} = lectura del potencial al equilibrio(con agitación).

ANEXO III. CURVAS CALIBRACIÓN.

En esta sección se presentan las curvas de calibración obtenidas a partir de los resultados experimentales utilizadas para determinar las ecuaciones de Nikolsky para GSH y para GSSG. Los límites de confianza y el análisis de resultados se calcularon con Origin 4.

Determinación de la ecuación de Nikolsky, $[E]_{i=0}=F(\text{Log}c)$, para el Electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ selectivo a GSH sobre el TLME 1.

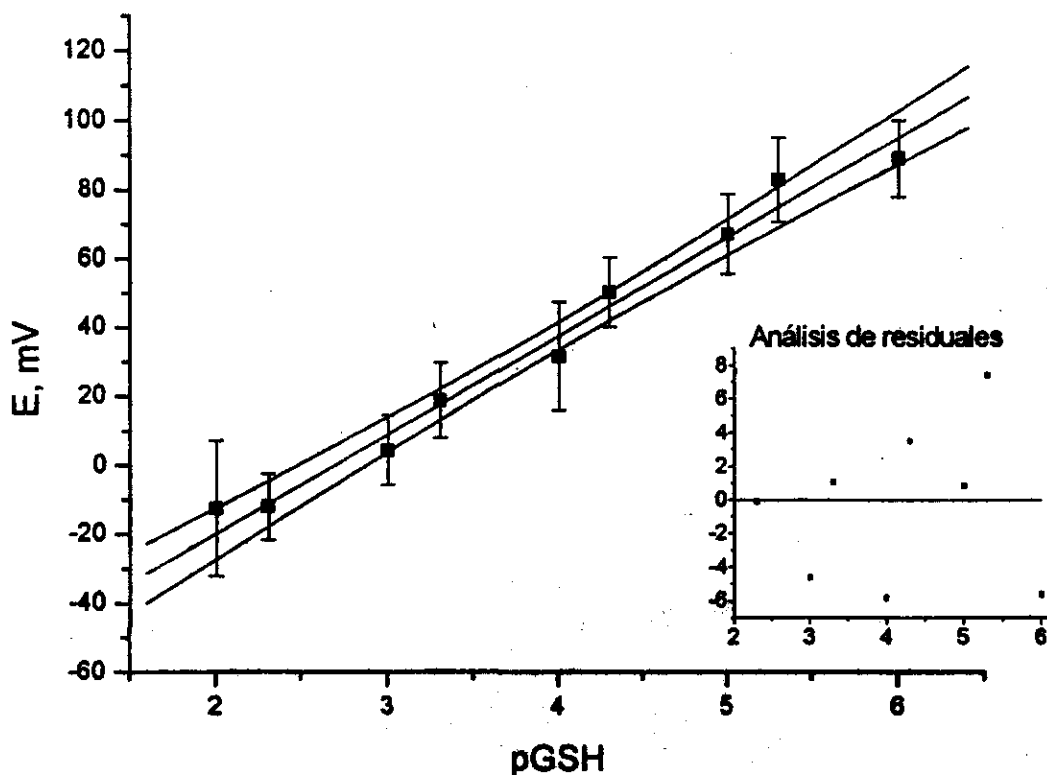


Figura AIII.1 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 1. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_i).

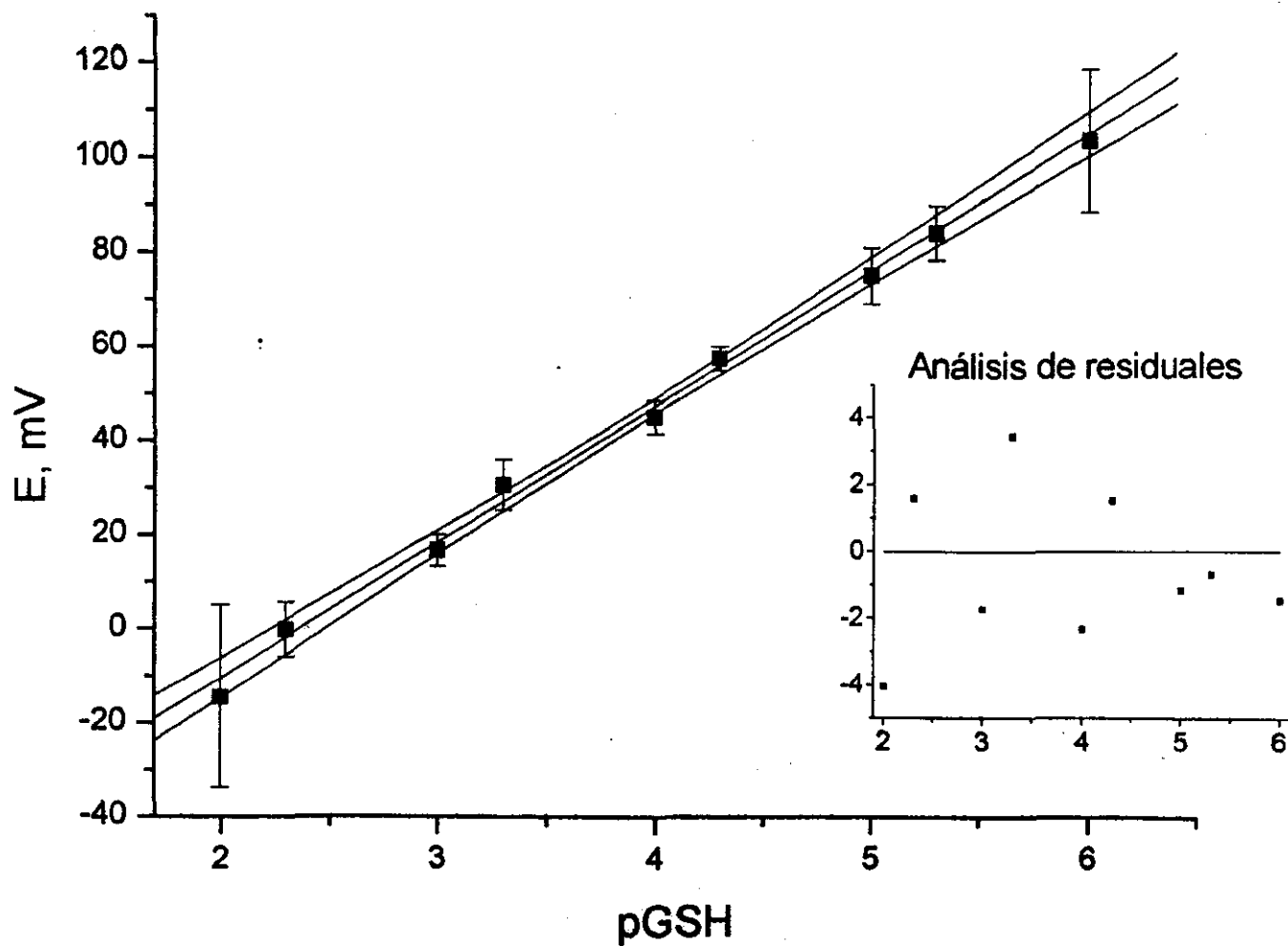


Figura AIII.2 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 1. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_{II}).

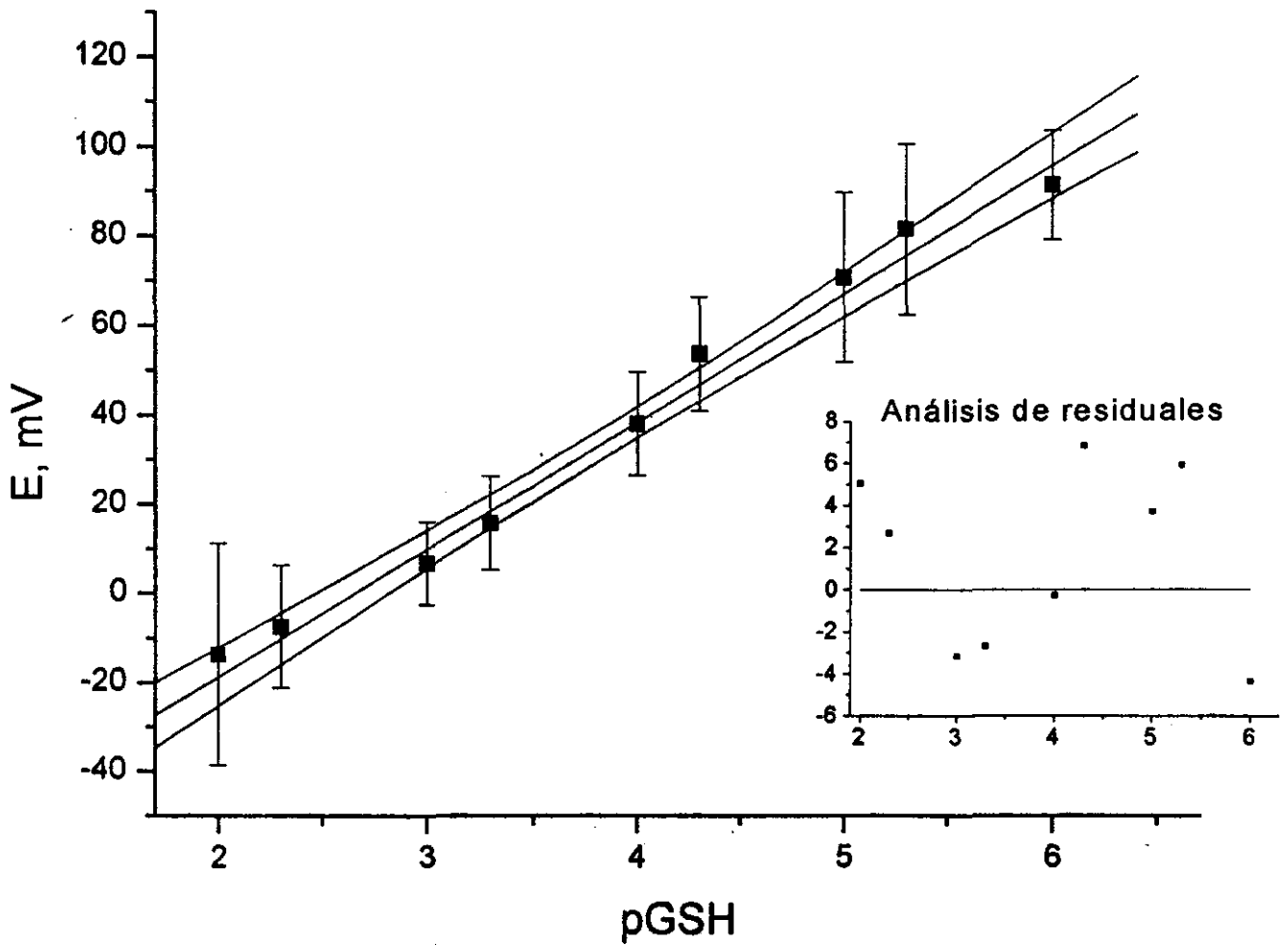


Figura AIII.3 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 1. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_{III}).

Determinación de la ecuación de Nikolsky, $[E]_{t=0}=F(\text{Log}c)$, para el Electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ selectivo a GSH sobre el TLME 2.

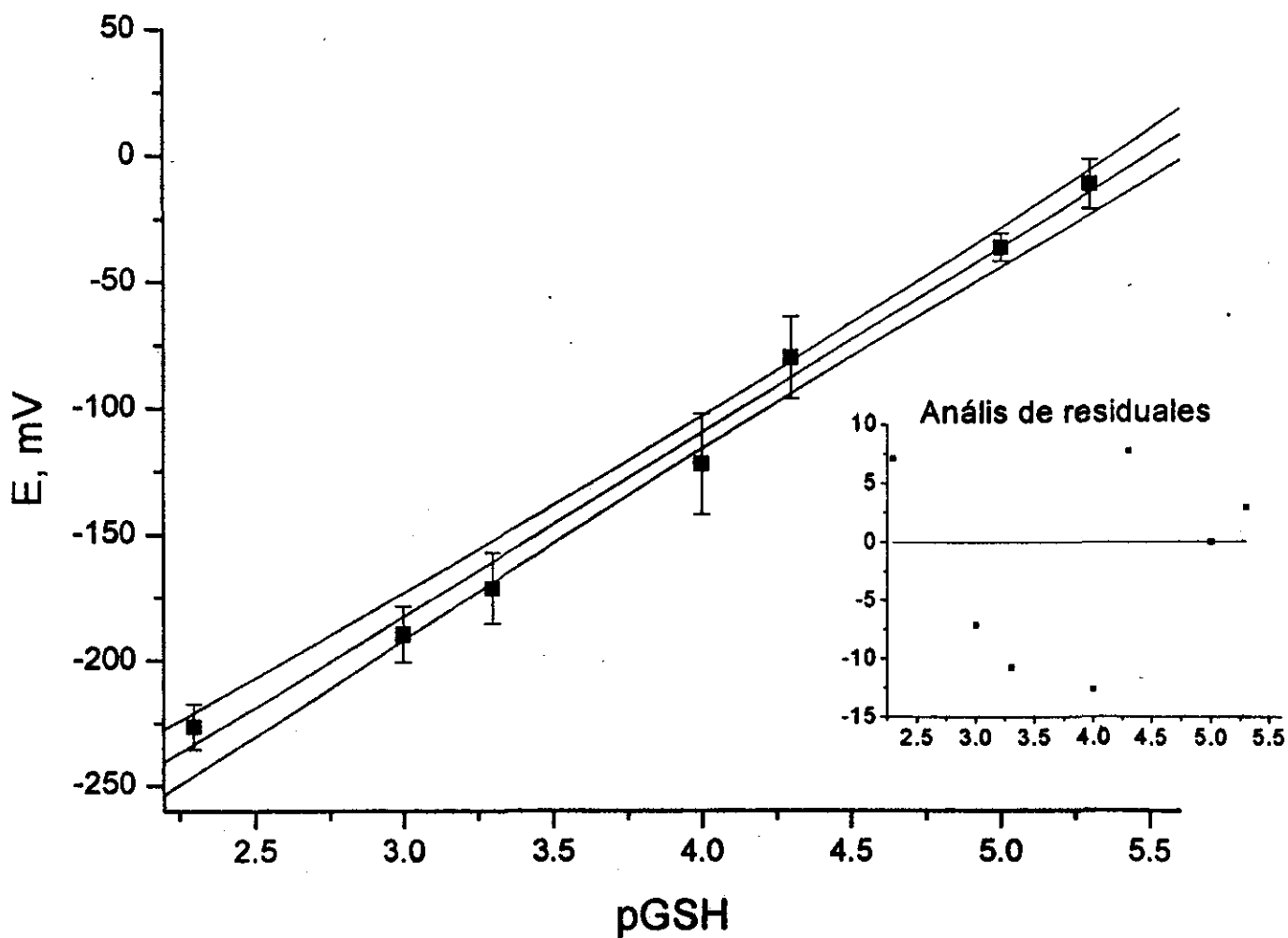


Figura AIII.4 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 2. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_i).

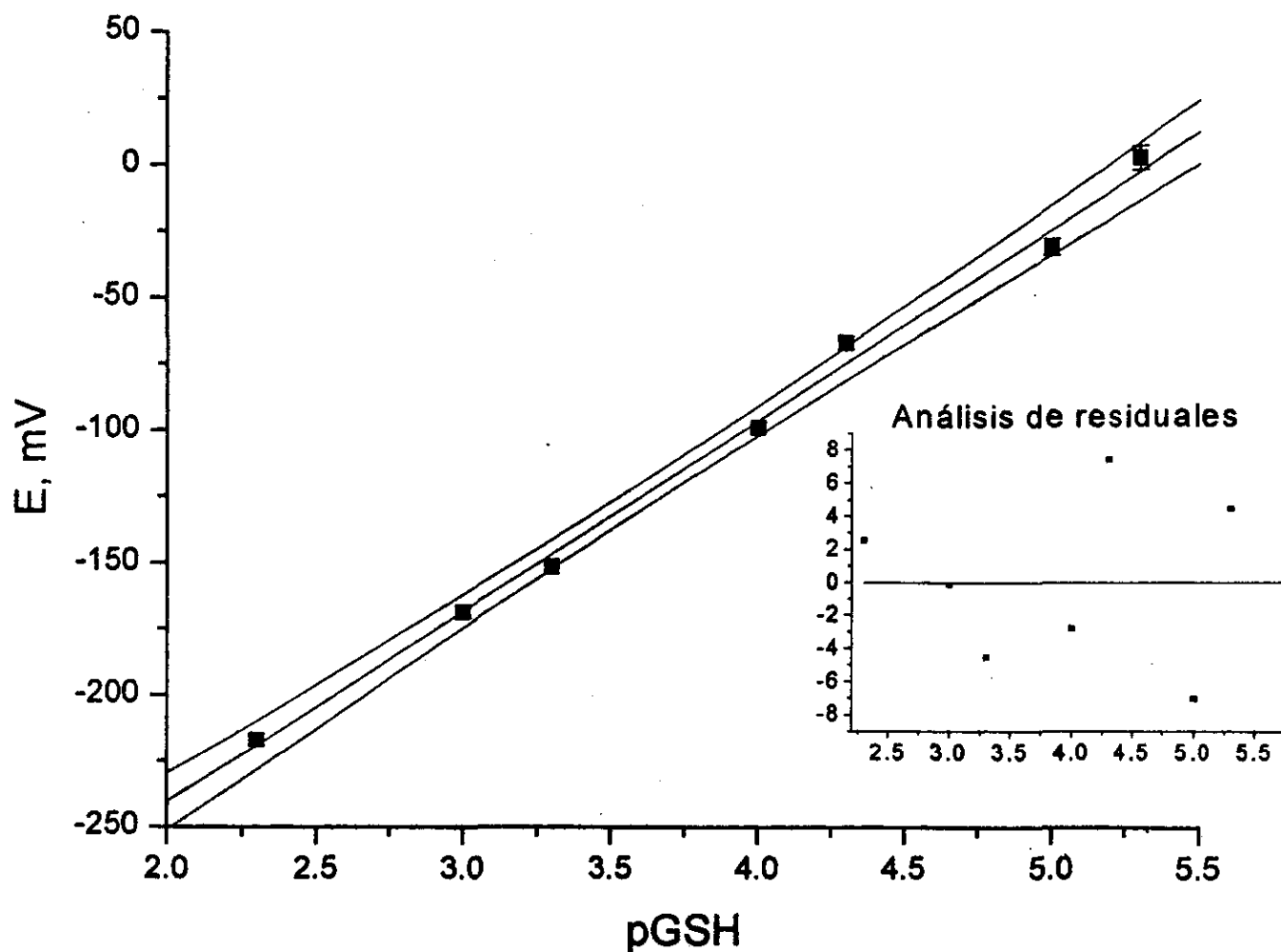


Figura AIII.5 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 2. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_0).

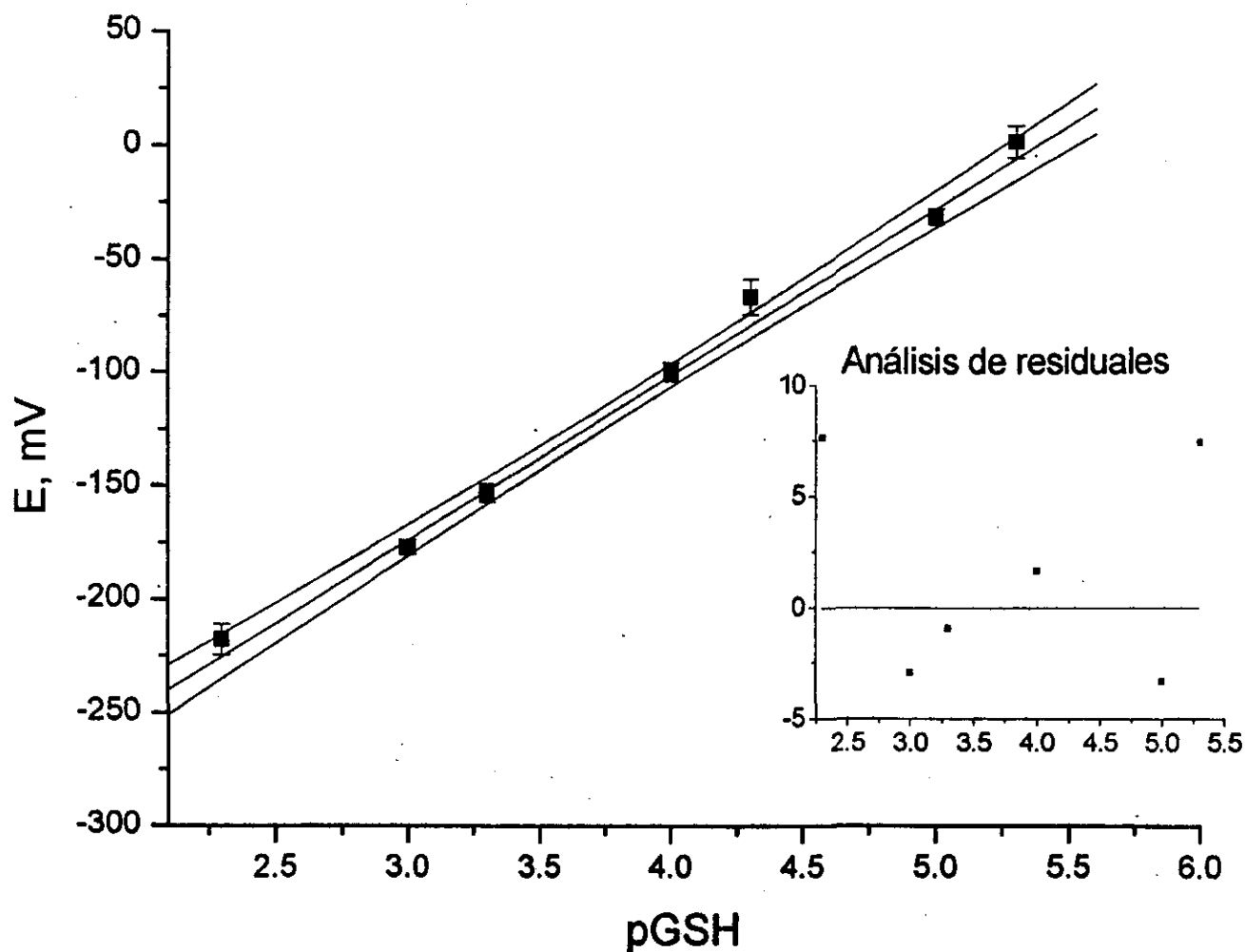


Figura AIII.6 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSH obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 2. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_{III}).

Determinación de la ecuación de Nikolsky, $[E]_{t=0}=F(\text{Log}c)$, para el Electrodo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ selectivo a GSSG sobre el TLME 1.

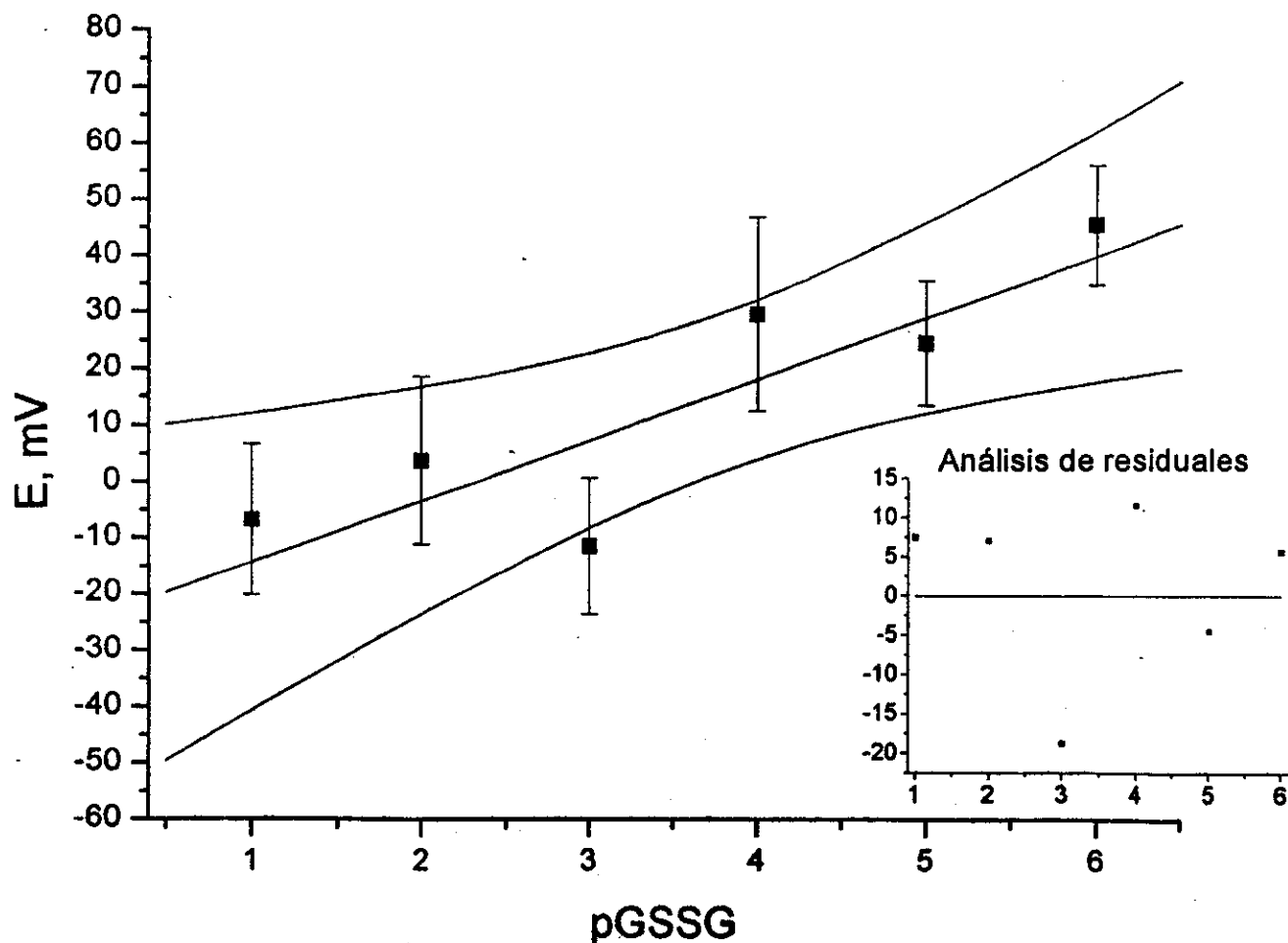


Figura AIII7 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSSG obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 1. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_i).

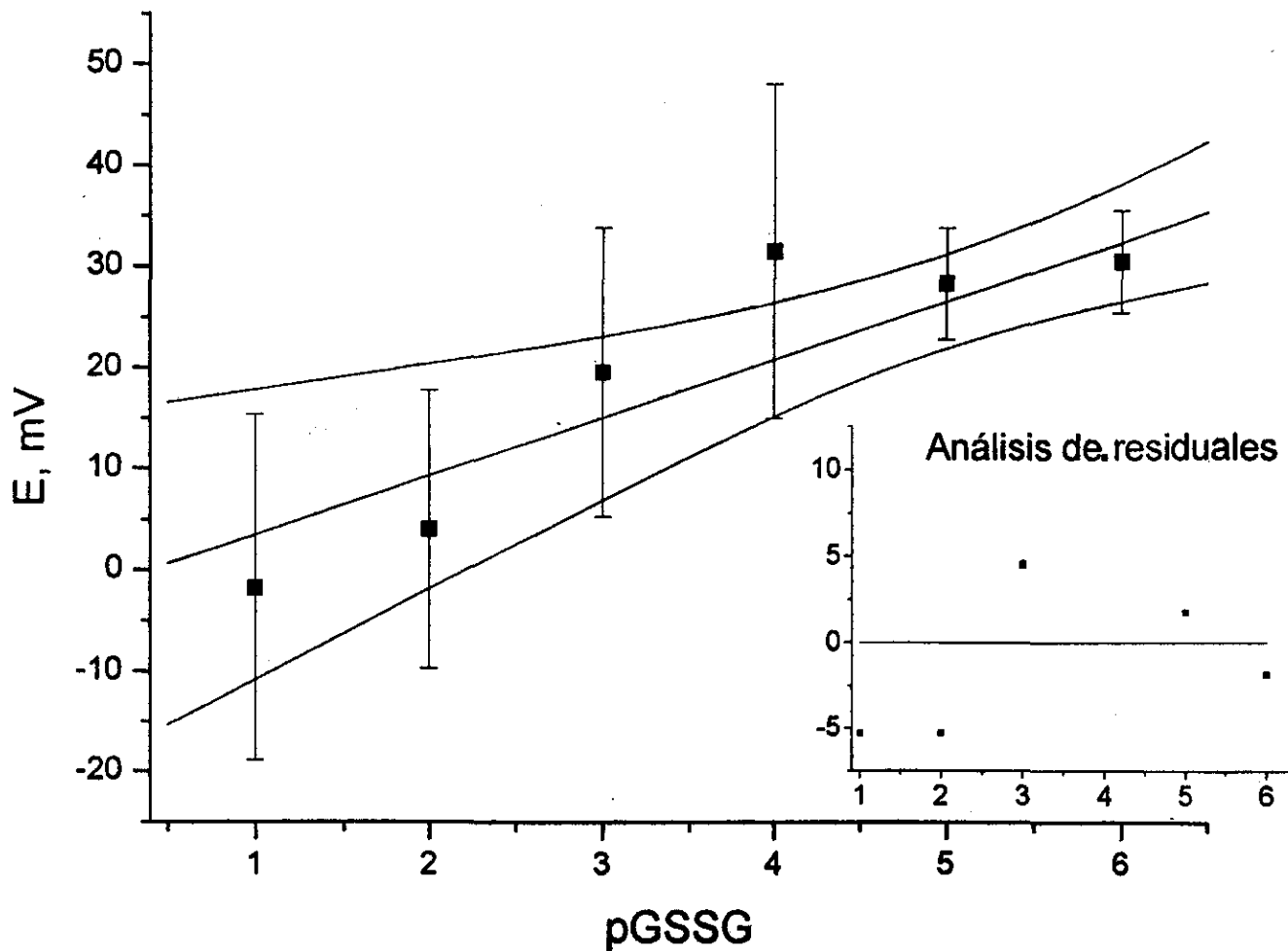


Figura AIII.8 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSSG obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[\text{Hg}(\text{GS})_x]$ formado sobre el TLME 1. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_{11}).

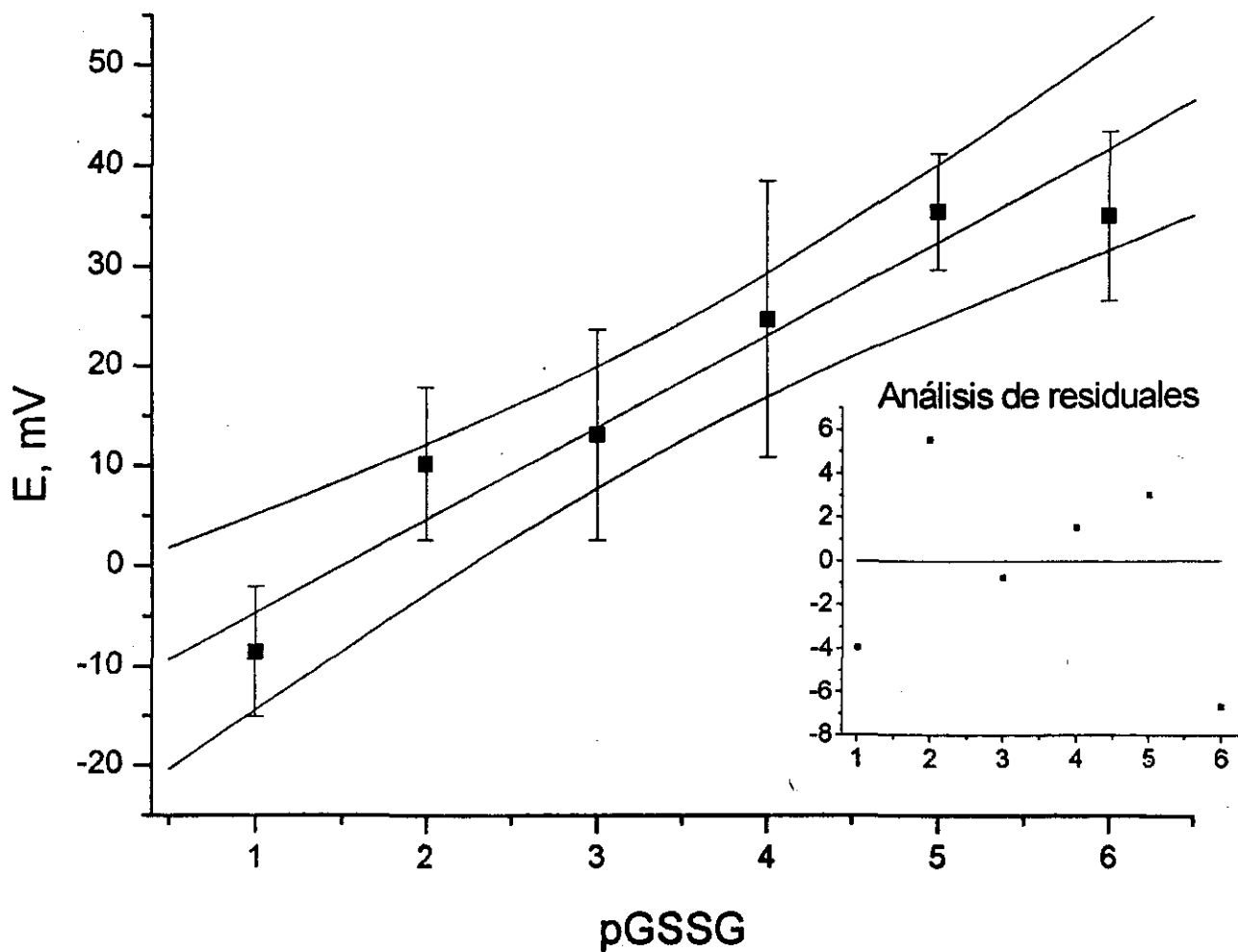


Figura AIII.9 Curva de calibración ponderada con los correspondientes errores asociados a cada punto y los límites de confianza al 95 % para estándares de GSSG obtenida con el electrodo selectivo de capa de $[Hg(GS)_x]$ formado sobre el TLME 1. Las lecturas corresponden al potencial inicial (E_{III}).

REFERENCIAS

1. A. Baeza, *et al.* "Estudio electroanalítico del glutatión." Parte I, II y III. Memorias del XI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica, Jalapa, Veracruz, 1996, 115-131.
2. A. Meister, *J. Biol. Chem.*, (1988) 263, 17205.
3. H. Waelsch, Certain Aspects of Intermediary Metabolism of Glutamine, Asparagine and Glutathione in: F.F. Nord (ed), *Advances in Enzimology*, Vol. XIII, Interscience Publishers, inc., New York (1952) pp. 237-319.
4. O.W. Griffith, *Anal. Biochem.*, (1980) 106, 207.
5. D. Eberle, R. Clarke, N. Kaplowitz, *J. Biol. Biochem.*, (1981) 256, 2115.
6. R. C. Fahey, C. Brown, W. B. Adams, M. B. Worshman, *J. Bacteriol.*, (1978) 133, 1126.
7. R. C. Fahey, G. L. Newton, B. Arrick, T. Overdank-Bogart, S. B. Aley, *Science*, (1984) 224, 70.
8. A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.*, (1983) 52, 711.
9. A. Meister, *Enzymes*, (1974) 10, 671.
10. H. Kumagai, R. Nakayama, T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.*, (1982) 46, 1301.
11. R. Sekura, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, (1977) 252, 2599.
12. O. W. Griffith, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, (1978) 253, 2333.
13. L. Oppeheimer, V. P. Wellner, O. W. Griffith, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, (1979) 254, 5184.
14. A. Meister, S. S. Tate, O. W. Griffith, *Methods Enzymol.*, (1981) 77, 237.
15. S. S. Tate A. Meister, *Mol. Cell. Biochem.*, (1981) 39, 357.
16. A. Meister, S. S. Tate, *Ann. Rev. Biochem.*, (1976) 45, 559.
17. O. W. Griffith, R. J. Bridges, A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1978) 75, 5405.
18. J. D. Schulman, S. I. Goodman, J. W. Mace, A. D. Patrick, F. Tietze, E. J. Butler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1975) 65, 68.

19. D. Haberle, A. Wahllander, H. Seis, *FEBS Lett.*, (1979) 108, 335.
20. G. M. Bartoli, H. Seis, *FEBS Lett.*, (1978) 86, 89.
21. H. Seis, C. Gerstenecker, K. H. Summer, H. Menzel, L. Flohe, *FEBS Lett.*, (1972) 27, 171.
22. O. W. Griffith, R. J. Bridges, A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, (1979) 76, 6319.
23. E. S. Guzmán-Barrón, *Adv. Enzymol.*, (1951) 11, 201.
24. M. Guichard, G. Jensen, A. Meister, E. Malaise, *Proc. Radiation Research Society*, (1983), 10.
25. O. W. Griffith, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, (1979) 254, 7558.
26. N. Tateishi, T. Higashi, A. Naruse, K. Hikita, Y. Sakamoto, *J. Biochem.*, (1981) 90, 1603.
27. B. A. Arrick, C. F. Nathan, O. W. Griffith, Z. A. Cohn, *J. Biol. Chem.*, (1982) 257, 1231.
28. A. Meister, O. W. Griffith, *Cancer Treat. Rep.*, (1979) 63, 1115.
29. A. M. Novi, *Science*, (1981) 212, 541.
30. Kreuz, K., Tommasini, R. y Martinoia, E., *Plant Physiol* (1996). 111:349-353.
31. Howden, R., Goldsbrough, C.R., Anderson, C.R. y Cobbett, C.S., *Plant Physiol.*, (1995) 107 107:1059-1066.
32. E. C. Abraham, J. F. Taylor, C. A. Lang, *Biochem. J.*, (1978) 174, 819.
33. I. M. Kolthoff, W. Stricks and N. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, (1955) 77, 4739.
34. I. R. Miller and J. Teva, *J. Electroanal. Chem.*, (1972) 36, 157.
35. J. Koryta and J. Pradac, *J. Electroanal. Chem.*, (1968) 17, 177.
36. M. T. Stankovich and A. J. Bard, *J. Electroanal. Chem.*, (1977) 75, 478.
37. P. J. Hissin, R. Hilf, *Anal. Biochem.*, (1976) 74, 214.
38. E. Beutler, C. West, *Anal. Biochem.*, (1977) 81, 458.
39. R. R. Grunet, R. H. Philips, *Arch. Biochem. and Biophys.*, (1951) 30, 217.
40. J. Sedlak, R. H. Linsay, *Anal. Biochem.*, (1986) 25, 101.
41. V. H. Cohn, J. Lyle, *Anal. Biochem.*, (1966) 14, 434.

42. E. Beutler, C. West, *Anal. Biochem.*, (1977) 81, 458.
43. W. Stricks, I. M. Kolthoff, *J. Am. Chem. Soc.*, (1953) 75, 5673.
44. L. Binet, G. Welle, *Compt. Rend.*, (1935) 198, 1185.
45. N. W. Pirie, *Biochem. J.*, (1930) 24, 51.
46. K. Lohmann, *Biochem. Z.* (1932) 254, 332.
47. E. Racker, *J. Biol. Chem.*, (1951) 190, 695.
48. O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, (1980) 106, 207.
49. J. E. Brehe, H. B. Burch, *Anal. Biochem.*, (1976) 74, 189.
50. L. Lack, M. Smith, *Anal. Biochem.*, (1964) 8, 217.
51. M. Koivusalo, L. Uotila, *Anal. Biochem.*, (1974) 59, 34.
52. K. Asaoka, K. Takahashi, *J. Biochem.*, (1981) 90, 1237.
53. Becker, Katja; Gui, Ming; Traxler, Annette; *Histochemistry*, (1994) 102(5), 389.
54. Coutelle, C., *Ann. Biol. Clin.*, (1992) 50(2), 71.
55. A. Fujita and I. Numata, *Biochem. Z.*, (1938) 299, 249.
56. C. W. Tabor, H. Tabor, *Anal. Biochem.*, (1977) 78, 543.
57. J. D. Schofield, X. Chen, *J. of Cereal Science*, (1995) 21, 127.
58. D. J. Reed, J. R. Babson, *Anal. Biochem.*, (1980) 1106, 55.
59. M. W. Davey, G. Bauw, M.V. Montagu, *J. of Chromatography B*, (1997) 697, 269.
60. Method in Enzimology, Vol. 105, 1984, Academic Press, Inc., p114.
61. R. E. Benesch and R. Bensch, *Arch. Biochem. and Biophys.*, (1950) 28, 43.
62. J. M. Miller and L. B. Rockland, *Arch. Biochem. and Biophys.*, (1952) 409, 416.
63. A. C. Le Gall, C. M. G van der Berg, *Analyst*, (1993) 118(11), 1411.
64. S. A. Wring, J. P. Hart, B. J. Birch, *Analyst*, (1989) 114, 1563.
65. D. Compagnone, G. Federici, L. Scarciglia, G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.* (1993) 8(5), 257.
66. D. Compagnone, G. Federici, L. Scarciglia, G. Palleschi, *Anal. Lett.*, (1994) 27(1), 15.

67. Z. Haung, R.L. Villarta-Snow, G. J. Lubrano, G. G. Guibault, *Anal. Lett.*, (1994) 27(2), 263.
68. E. P. Gallaguer, T. Kavanagh, D. L. Eaton, *Methods Toxicol.*, (1994) 1B (in Vitro Toxicity Indicators), 349.
69. M. E. Anderson, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, (1980) 255, 9530.
70. E. Martínez-Fabregas, S. Alegret, *J. Chem. Ed.* (1994) 71, A67.
71. W. R. Seitz, *Anal. Chem.*, (1984) 56(1), 16^a.
72. K. Mosbach, B. Danielsson, *Anal. Chem.*, (1981) 53(1), 83^a.
73. J. Janata, Chemical Sensors, Plenum, New York, 1989.
74. H. Freiser, Ion-Selective Electrodes in Analytical Chemistry, Plenum, New York, 1980
75. Jane E. Frew, H. Allen O. Hill, *Anal. Chem.*, (1987) 59(15), 933^a.
76. J. D. Czaban, *Anal. Chem.*, (1985) 57(2), 345^a.
77. A. J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, Wiley, New York, 1980.
78. José Alejandro Baeza Reyes, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, 1997.
79. M. J. Powers, T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, (1980) 102, 1289
80. J. M. Bobbitt, J. P. Wills, *J. Org. Chem.*, (1980) 45, 1978.
81. C. A. Rice, J. T. Spence, *Inorg. Chem.*, (1980) 19, 2845.
82. R. S. Nicholson, R. S. Shain, *Anal. Chem.*, (1964) 36, 704.
83. P. T. Kissinger, W. R. Heineman, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
84. W. M. Schwarz, I. Shain, *J. Phys. Chem.*, (1965) 69, 30.
85. M. L. Olmstead, R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, (1969) 41, 851.
86. J. Koryta, *Anal. Chim. Acta*, (1977) 91, 1
87. G. H. Fricke, *Anal. Chem.*, (1980) 52, 259R
88. G. G. Guilbault, *Pure Appl. Chem.*, (1976) 48, 127
89. E. Pungor, K. Toth y A. Hrabeczy-Pall, *Pure Appl. Chem.*, (1970) 51, 1913.

-
90. R. G. Bates y V. E. Bower, Handbook of Analytical Chemistry, Ed. McGraw-Hill, Nueva York, 1963.
91. Zhiqiang Gao, Kok Siong Siow, *Electrochimica Acta*, (1997) 42(2), 315.
92. R. Philipp, U. Retter, *Electrochimica Acta*, (1995) 40(11), 1581.
93. R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, (1963) 85, 3533.
94. B. H. Vassos, G. W. Ewing, Electroquímica Analítica, Ed. Limusa, 1987, México.