

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN EN CEREBRO
DE RATA MEDIANTE POLAROGRAFÍA”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
Q. ALEJANDRA NÚÑEZ PINEDA



TUTOR: DR. BERNARDO A. FRONTANA URIBE

2005.

m. 345314



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.

Este trabajo se realizó en el **laboratorio de Electroquímica y Electrosíntesis del Instituto de Química de la UNAM**, bajo la dirección del Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe y en colaboración con el Departamento de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM.

Este trabajo se presentó en:

“IV Simposio Interinstitucional de Electroquímica Molecular”

(Instituto de Química – UNAM, 8-9 de julio de 2004)

“Seminario Departamental del Departamento de Productos Naturales”

(Instituto de Química – UNAM, 8 de marzo de 2005)

“XX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y

V Congreso Anual de la Sociedad Mexicana de Hidrógeno”

(San José Vista Hermosa, Morelos, 22-27 de mayo de 2005)

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandra Núñez

J. Pineda

FECHA: 10 de junio de 2005

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Bernardo Antonio Fronta Uribe**, por el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto.

Al **M. en C. Antonio Nieto Camacho**, por el apoyo en la preparación de las muestras biológicas y sus comentarios.

Al **Q. Carlos Eduardo Frontana Vazquez**, por sus atinadas sugerencias.

Al **H. Jurado**, por sus comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo de tesis.

Al **CONACyT**, por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

DEDICATORIAS

Con mucho cariño para mi mamá, hermanos, sobrinos y todas las personas
que me brindan su cariño y apoyo incondicional.

Índice	Página
I. Introducción	1
II Hipótesis	3
III. Objetivos	4
IV. Antecedentes	
4.1 Métodos electroanalíticos	5
4.2 Principio de las técnicas voltamperométricas	5
4.3 Polarografía convencional o de corriente directa	6
4.4 Polarografía de pulsos	8
4.4.1 Polarografía tast	9
4.4.2 Polarografía de pulso normal	11
4.4.3 Polarografía diferencial de pulsos	12
4.4.4 Cronoamperometría de pulso directo	14
4.5 Glutación	16
4.5.1 Glutación y su relación con el estrés oxidativo	16
4.5.2 Generalidades del glutación	17
4.5.3 Regulación de los niveles del glutación	18
4.5.4 Glutación en el cerebro	20
4.5.5 La enfermedad de Parkinson	20
4.5.6 Glutación y la enfermedad de Parkinson	21
4.5.7 Glutación y la <i>diabetes mellitus</i>	21
4.6 Validación de los métodos analíticos	22
4.6.1 Confirmación de la identidad	23
4.6.2 Selectividad/especificidad	23
4.6.3 Límite de detección y límite de cuantificación	24
4.6.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal	25
4.6.5 Exactitud	26
4.6.6 Incertidumbre de medición	26
4.6.7 Sensibilidad	27
4.6.8 Recuperación	28
4.6.9 Robustez	29

V. Metodología Experimental

5.1	Equipo, materiales y reactivos	30
5.2	Preparación del homogenizado de cerebro de rata	33
5.2.1	Preparación del homogenizado para la aplicación del método espectrofotométrico	34
5.2.2	Preparación del homogenizado para la Aplicación de los métodos polarográficos	34
5.3	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	35
5.4	Efecto del tamaño de la gota de mercurio	35
5.5	Optimización de las variables propias de la polarografía de pulso normal	36
5.5.1	Incremento del barrido	37
5.5.2	Tiempo de goteo	38
5.5.3	Duración del pulso	38
5.6	Compensación de la caída óhmica	38
5.7	Efecto de la velocidad de barrido en el sistema del GSH	39
5.8	Desplazamiento de las señales del GSH en función del pH en voltamperometría cíclica y polarografía de pulso normal	39
5.9	Validación de los métodos de polarografía de pulso normal y cronoamperometría	40
5.9.1	Calificación del equipo	40
5.9.2	Parámetros de desempeño de los métodos	40
5.9.2.1	Confirmación de la identidad	40
5.9.2.2	Selectividad/especificidad	41
5.9.2.3	Límite de detección y límite de cuantificación	41
5.9.2.4	Intervalo de trabajo e intervalo lineal	42
5.9.2.5	Exactitud	42
5.9.2.6	Incertidumbre de medición	42
5.9.2.7	Sensibilidad	42
5.9.2.8	Recuperación	43

VI. Resultados, Análisis y Discusión

6.1	Dominio de electroactividad	44
6.2	Variación de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica	46
6.3	Efecto del pH sobre el sistema GSH/GSSG	48
6.3.1	Comportamiento de las señales del GSH en función del pH en voltamperometría cíclica	48
6.3.2	Comportamiento de las señales del GSH en función del pH en polarografía de pulso normal	50
6.3.3	Estequiometría de la reacción electroquímica	51
6.4	Optimización de los parámetros de la polarografía de pulso normal	53
6.4.1	Incremento del barrido	53
6.4.2	Tiempo de goteo	54
6.4.3	Duración del pulso	55
6.5	Efecto del tamaño de la gota de mercurio	56
6.6	Aplicación de la polarografía de pulso normal y la cronoamperometría para la cuantificación del GSH	58
6.7	Validación de los métodos polarográficos	64
6.7.1	Calificación del equipo	64
6.7.1.1	Respuesta electrónica del equipo	64
6.7.1.2	Verificación de la calibración del equipo	65
6.7.2	Parámetros de desempeño de los métodos	66
6.6.2.1	Confirmación de la identidad	66
6.6.2.2	Selectividad/especificidad	69
6.7.2.3	Límite de detección y límite de cuantificación	74
6.7.2.4	Intervalo de trabajo e intervalo lineal	77
6.7.2.5	Exactitud	79
6.7.2.6	Incertidumbre de medición	82
6.7.2.7	Sensibilidad	84
6.7.2.8	Recuperación	86
6.7.2.9	Robustez	87

VII.	Conclusiones	89
VIII.	Perspectivas	91
IX.	Bibliografía	92
X.	Anexos	
	Anexo 1: Estabilidad de la señal del glutatión en la muestra biológica	96
	Anexo 2: Curva de calibración de albúmina bovina por un método espectrofotométrico	98
	Anexo 3: Determinación del contenido de glutatión en los homogenizados de cerebro de rata con la técnica de adiciones estándar	100
	Anexo 4: Curva de calibración del glutatión determinada espectrofotométricamente	103
	Anexo 5: Aplicación de la polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación del glutatión	106

GSH	glutación en su forma reducida
GSSG	glutación en su forma oxidada
[GSH]	concentración de glutación
SH	grupo funcional tiol
EGM	electrodo goteante de mercurio
EMGP	electrodo de mercurio de gota pendiente
E	potencial aplicado
$E_{1/2}$	potencial de media onda
E1	potencial del pulso
PI	potencial base ó inicial
V1	potencial de inversión
RNC	resistencia no compensada
I	corriente
I_f	corriente faradaica
I_c	corriente capacitiva
I_d	corriente de difusión
n	número de electrones
D_o	coeficiente de difusión
m	flujo de mercurio
t_{max}	tiempo de vida de la gota
C_o^*	concentración de la especie en solución
F	constante de Faraday, 96500 C/mol
R	constante de los gases ideales, 8.316 J/molK
A	área del electrodo
IB	incremento del barrido
TG	tiempo de goteo
AP	ancho del pulso
DP	altura del pulso
VB	velocidad de barrido

T1	duración del pulso
τ'	tiempo donde inicia la aplicación de un pulso de potencial
τ	tiempo donde se realiza el muestreo de corriente
A	amperes
μ A	microamperes
V	volts
mV	milivolts
s	segundos
M	concentración molar
mM	concentración milimolar
μ M	concentración micromolar
[albúmina]	concentración de la albúmina bovina

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Se conoce como estrés oxidativo a la consecuencia de la alteración en el equilibrio de la producción de especies reactivas de oxígeno tales como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el radical alcoxilo y el peroxilo. Estas especies son generadas durante el metabolismo oxidativo en las células de los seres vivos. A su vez, el estrés oxidativo parece estar relacionado con la degeneración muerte de neuronas en las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica; además de estar implicado en enfermedades como la inflamación de riñones, diabetes, formación de cataratas y daños renales, entre otras [1].

Se ha encontrado que el estado redox dentro de las células está regulado por la contribución de diferentes pares redox, siendo los tres más importantes: el dinucleótido adenín nicotinamida fosfato ($NADPH/NADP^+$), la tioredoxina (TRX_{red}/TRX_{ox}) y el glutatión ($GSH/GSSG$). Entre ellos, el sistema del glutatión es el más importante, ya que la concentración intracelular de glutatión es de 500 a 1000 veces mayor que la de TRX y NADPH [2,3]. Por lo anterior, los cambios en la relación de concentraciones de GSH/GSSG se reflejan directamente en las alteraciones redox intracelulares.

Hay evidencia de que el glutatión (GSH) juega un papel importante en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno en el cerebro, por ende, una de sus principales funciones consiste en ser un antioxidante, es decir, actuar como agente reductor en el metabolismo de H_2O_2 , peróxidos orgánicos y especies reactivas de oxígeno. De acuerdo a lo anterior, el grado de estrés oxidativo en células se puede determinar por el incremento en la concentración de glutatión en su forma oxidada (GSSG), el decremento en a concentración del GSH y la disminución en la relación GSH/GSSG. Además, en condiciones fisiológicas normales, la forma reducida del glutatión es de 10 a 100 veces mayor que la de la forma oxidada [4].

Por otro lado, la determinación de tioles ha constituido un reto en el área electroanalítica, ya que la oxidación directa del grupo tiol (SH) se ve afectada por la pobre respuesta voltamperométrica en electrodos sólidos. Además de que, en general, se requieren potenciales anódicos grandes para obtener una respuesta del tiol, lo que conduce a la oxidación de otras especies presentes en la matriz de trabajo [5,44].

A pesar de que se han empleado la cromatografía de líquidos y la electroforesis como técnicas de separación, con las cuales se ha logrado una mejor resolución, el análisis de muestras y la calibración requieren generalmente la preparación de derivados. Es por esto que existe un mérito considerable en la simplicidad que ofrecen las técnicas polarográficas, ya que permiten realizar el análisis de muestras de forma directa y con una preparación previa mínima.

De esta manera, en el presente trabajo se propone el desarrollo de un método que permite determinar la concentración de glutatión en su forma reducida en homogenizados de cerebro de roedores, por polarografía de pulso normal y cronoamperometría.

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

Dado que el glutatión es una sustancia electroactiva en el electrodo de mercurio, su señal polarográfica permitirá establecer una metodología analítica para evaluar su contenido en una matriz biológica.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar un método polarográfico de pulsos de potencial para determinar el contenido de glutatión en homogenizados de cerebro de roedores.

Objetivos particulares:

- 1) Caracterizar la señal del glutatión y optimizar los parámetros de la polarografía de pulso normal.
- 2) Determinar el comportamiento electroquímico del sistema del glutatión por polarografía de pulso normal y voltamperometría cíclica en función de la variación del pH de la solución.
- 3) Realizar la calificación del equipo empleado en el desarrollo del método.
- 4) Evaluar los parámetros de desempeño del método
- 5) Cuantificar el contenido de glutatión en los homogenizados de cerebro de rata de la cepa Wistar.

IV. ANTECEDENTES

IV. ANTECEDENTES

4.1 Métodos electroanalíticos

Los métodos electroanalíticos son aquellos que implican la interacción de variables eléctricas de un sistema tales como la corriente y el potencial con variables químicas como la concentración, con la particularidad de que los procesos electroquímicos se llevan a cabo en la interfase electrodo-solución. La diferencia entre las técnicas electroanalíticas depende del tipo de señal eléctrica que se emplea para la cuantificación. Los dos tipos principales de medidas electroanalíticas son la potenciometría y la potencioestática [6]

La potenciometría se basa en situaciones de corriente constante y generalmente se realizan a un valor de corriente cero (también hay potenciometría de corriente impuesta). En esta técnica la información relacionada con la composición de la muestra se obtiene a partir de la medida de potencial que se establece a través de una membrana.

Las técnicas potencioestáticas o de potencial controlado se basan en situaciones donde la corriente es diferente de cero; el potencial de electrodo se usa para dirigir una reacción de transferencia electrónica y medir la corriente resultante. Dentro de estas técnicas, la voltamperometría -y en especial la polarografía- permiten análisis rápidos, sensibles y de bajo costo, por lo que centraremos la atención en ellas [6].

4.2 Principio de las técnicas voltamperométricas

Estas técnicas se caracterizan por la forma de aplicar el potencial al electrodo de trabajo y por el material usado para su construcción:

Polarografía: Esta técnica se refiere al uso de mercurio como electrodo de trabajo. En este caso, el electrodo trabaja también en condiciones dinámicas (electrodo goteante de mercurio, EGM). En esta técnica, la corriente límite es proporcional a la concentración del analito. La variable de perturbación del sistema consiste en un barrido lineal de potencial con respecto al tiempo. La respuesta que se observa es la corriente eléctrica, cuya magnitud es proporcional a una serie de factores, que varían en función de la técnica polarográfica en uso.

Voltamperometría: Esta técnica se refiere al uso de un electrodo de trabajo sólido, o si es de mercurio la superficie de trabajo permanece constante a lo largo del proceso electroquímico (electrodo de mercurio de gota pendiente, EMGP). La variable de perturbación del sistema, al igual que los métodos polarográficos, consiste en un barrido lineal de potencial con respecto al tiempo [8].

4.3 Polarografía convencional o de corriente directa

Fue descubierta en 1920, por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky. Es un tipo de voltamperometría con la particularidad mencionada de que el electrodo de trabajo es un electrodo goteante de mercurio. Esta técnica requiere que el barrido de potencial sea lineal y lo suficientemente lento para que el potencial permanezca prácticamente constante durante el tiempo de vida de la gota. Con ello se obtienen curvas de intensidad-potencial (I-E) del sistema analizado, las cuales se caracterizan por dos variables: el potencial de media onda ($E_{1/2}$) y la corriente límite de difusión (I_d), siendo esta última proporcional a la concentración de la especie en la solución. En la Figura 1 se presenta un polarograma típico obtenido por polarografía convencional, donde se indica la ubicación del potencial de media onda y la corriente límite de difusión. En dicho polarograma las oscilaciones de corriente se deben al crecimiento y caída de las gotas de mercurio. El límite de detección de esta técnica se encuentra alrededor de 10^{-5} M [8].

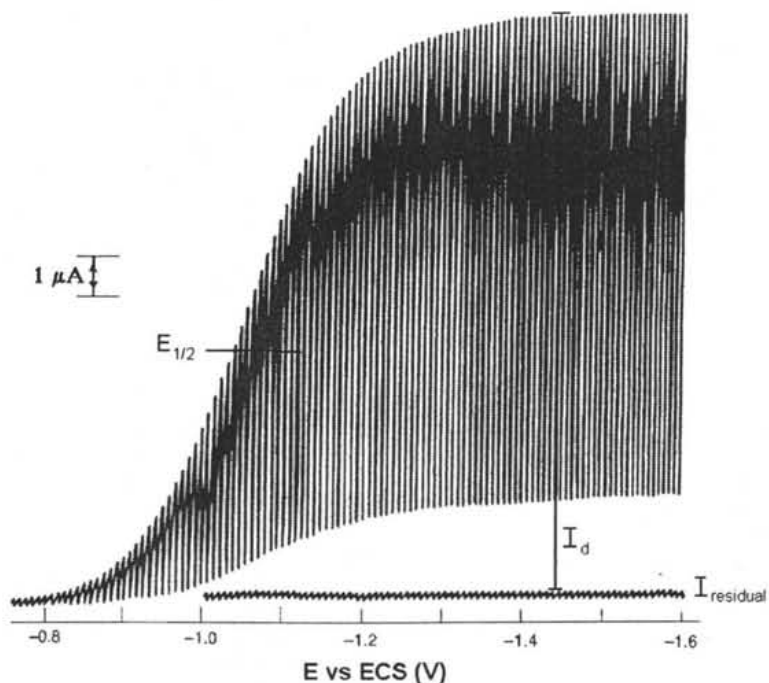


Figura 1. Polarograma obtenido mediante polarografía convencional. CrO_4^{2-} 1mM en solución de NaOH 0.1 M [8].

Por otro lado, la Figura 2 describe el flujo de corriente en un EGM. En dicha figura se aprecia que la corriente faradaica aumenta durante el tiempo de vida de la gota, mientras que la corriente capacitiva disminuye exponencialmente. Por lo anterior, es claro que si se desea optimizar la relación I_f/I_c , la corriente debe muestrearse justo antes de la caída de la gota. Este es el fundamento de la variante conocida como polarografía "tast", que se describirá en la siguiente sección.

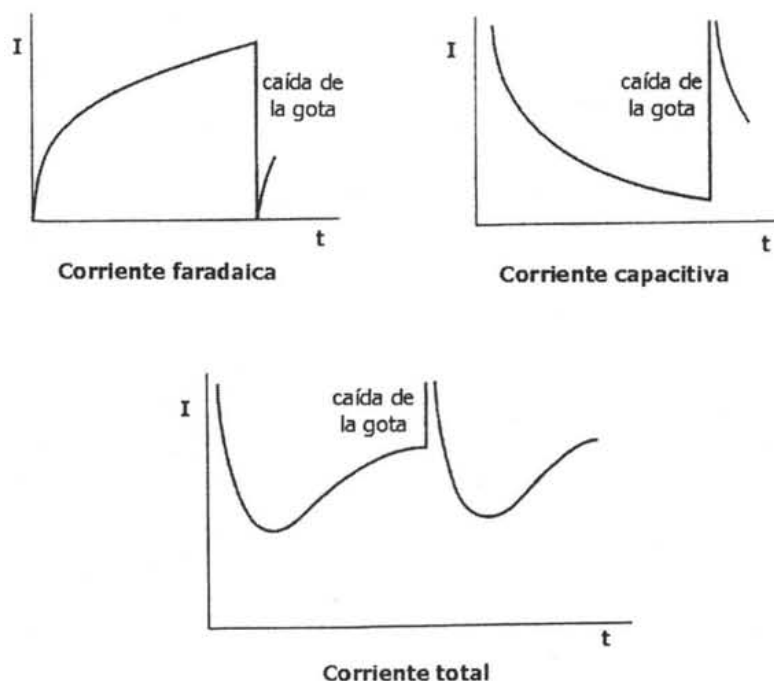


Figura 2. Flujo de corriente en un electrodo goteante de mercurio [8].

4.4 Polarografía de pulsos

Con la finalidad de aumentar la selectividad y sensibilidad de la polarografía, se han desarrollado variantes de la polarografía clásica, que implican un sistema de perturbación distinto. En lugar de variar linealmente el potencial, este se hace llegar al electrodo de trabajo en forma de pulsos de potencial, con una duración determinada. El muestreo de la corriente se realiza en ciertos instantes del tiempo de vida de la gota. Esto con el fin de suprimir la corriente capacitiva, que surge por la expansión continua de la gota de mercurio en un electrodo goteante. Lo anterior permite un incremento sustancial en las características analíticas de las técnicas de pulsos.

La polarografía de pulsos comprende 5 métodos:

- Polarografía tast o de corriente muestreada
- Polarografía de pulso normal
- Polarografía diferencial de pulsos
- Polarografía de pulso inverso
- Polarografía de pulso cuadrado

Tanto la polarografía tast, como la de pulso normal y la diferencial de pulsos tienen su base en la polarografía con el EGM, mientras que la polarografía de pulso inverso y la de pulso cuadrado fueron innovaciones posteriores.

4.4.1 Polarografía tast

Como se indica en la Figura 3, en la polarografía tast la corriente se muestrea electrónicamente a un tiempo fijo τ después del nacimiento de una gota de mercurio. La corriente se registra a ese tiempo τ justo antes de que caiga la gota. El potenciostato está prendido todo el tiempo y realiza el barrido mediante escalones de potencial de acuerdo a un programa en escalera. El resultado del experimento es una curva de corriente muestreada contra el potencial.

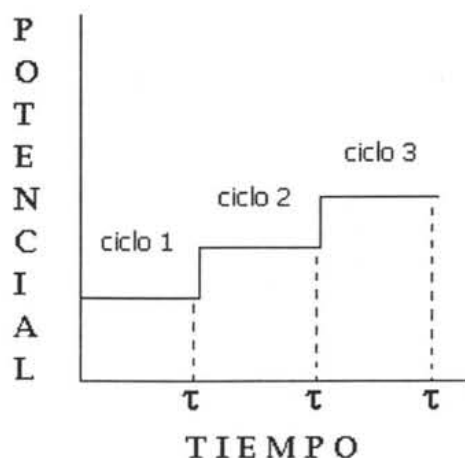


Figura 3. Perturbación de potencial en función del tiempo para la polarografía tast

La componente faradaica de la corriente muestreada está dada por la ecuación de Ilkovic (*ecuación1*):

$$I_{d(\tau)} = 708 nD_o^{1/2}C_o^* m^{2/3} \tau^{1/6} \quad (\text{ecuación1})$$

Donde $I_{d(\tau)}$ es la corriente límite de difusión; n es el número de electrones que la especie electrolizada intercambia en la reacción; D_o es el coeficiente de difusión de la especie; m es el flujo de la gota de mercurio, τ es el tiempo de vida de la gota y C_o^* es la concentración de la especie en la solución.

Las mejoras introducidas con el método tast brindaron límites de detección del orden de 10^{-6} M, ligeramente más bajos que para la polarografía convencional (10^{-5} M). En la Figura 4b se puede apreciar que el método tast elimina las oscilaciones de corriente debidas al cambio en el área de las gotas de mercurio (Figura 4a).

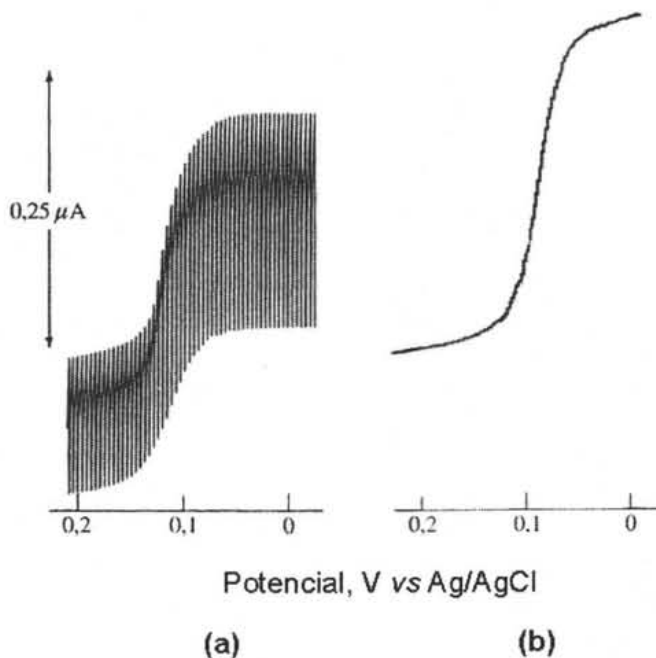


Figura 4. Comparación de ondas polarográficas: **(a)** modo convencional, **(b)** modo tast, en una solución 1×10^{-5} M de Cu^{2+} en NaNO_3 1 M [7].

4.4.2 Polarografía de pulso normal

Esta técnica se creó para evitar el efecto de disminución de la cantidad de sustancia que está siendo medida en la región cercana al electrodo, y que necesariamente reduce su flujo hacia la superficie y, por lo tanto, la corriente de respuesta. Para lograrlo, la técnica evita la electrólisis previa al periodo de medida.

Como se aprecia en la Figura 5, la mayor parte del tiempo de vida de la gota el electrodo se mantiene a un potencial inicial PI , en el cual ocurre una electrólisis despreciable. Después de un periodo de tiempo τ' , el potencial se cambia repentinamente a un valor E ; el pulso de potencial termina cuando se regresa al valor base PI y la corriente se muestrea al tiempo τ , cerca del final del pulso. Este programa de perturbación presenta una señal proporcional a la corriente muestreada, y es constante hasta que la lectura tomada con la siguiente gota la reemplaza. La gota es desalojada justo después de que termina el pulso, y entonces el ciclo total se repite con gotas sucesivas. El pulso de potencial se incrementa unos pocos milivoltios (IB) con cada ciclo adicional. Mediante esta técnica se obtiene una gráfica de corriente muestreada contra potencial, en forma de onda (Figura 6).

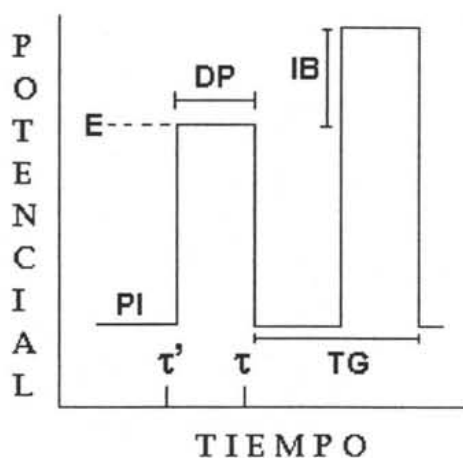


Figura 5. Perturbación de potencial en función del tiempo para polarografía de pulso normal. IB =incremento del barrido; TG =tiempo de goteo; DP =duración del pulso.

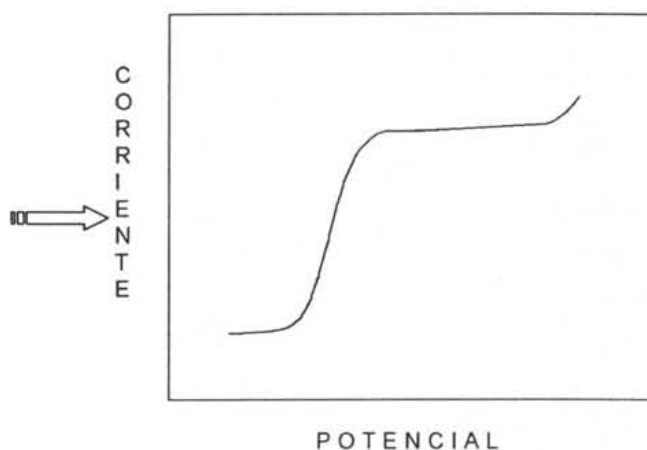


Figura 6. Señal típica de I vs E en polarografía de pulso normal.

Ya que la electrólisis durante el tiempo de espera es despreciable, la distribución de la concentración inicial se conserva hasta el momento en el que se aplica el pulso. Aunque el electrodo es aproximadamente esférico, se considera como una superficie plana durante el corto tiempo en el que ocurre la electrólisis. Por lo tanto, la corriente faradaica está dada por la *ecuación 2*.

$$i_d = \frac{nFAD_o^{1/2}C_o^*}{\pi^{1/2}(\tau-\tau')^{1/2}} \quad (\text{ecuación 2})$$

donde $(\tau-\tau')$ es el tiempo medido a partir del pulso. Comparado con la polarografía convencional, este método mejora en sensibilidad debido al incremento en la corriente faradaica, con lo que los límites de detección para esta técnica oscilan entre 10^{-6} y 10^{-7} M [8].

4.4.3 Polarografía diferencial de pulsos

Esta técnica se asemeja a la de pulso normal, considerando las siguientes diferencias:

- El potencial inicial (PI) que se aplica durante la mayor parte del tiempo de vida de la gota no es el mismo de gota a gota, sino que cambia de forma lineal y constante en incrementos pequeños (IB), como se aprecia en la Figura 7.
- La altura del pulso (AP) se mantiene constante respecto al potencial base.
- La corriente se muestrea dos veces durante el tiempo de vida de la gota. Una es al tiempo τ' antes del pulso y la segunda es al tiempo τ , al final del pulso justo antes de que la gota caiga.
- La curva obtenida es una gráfica de la diferencia de corriente $\delta(i)$ contra el potencial base. Donde $\delta(i) = i(\tau) - i(\tau')$, por lo que las señales obtenidas tienen la forma de picos (Figura 8).

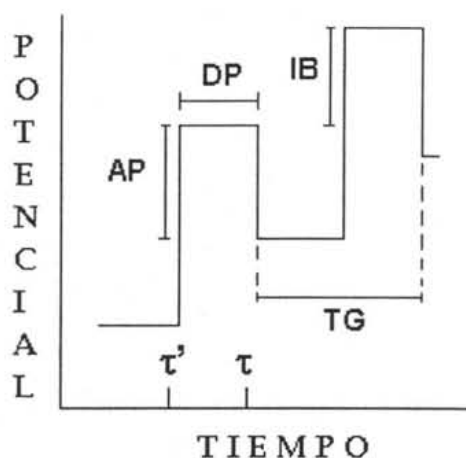


Figura 7. Perturbación de potencial en función del tiempo para polarografía diferencial de pulsos. IB=incremento del barrido; TG=tiempo de goteo; AP=altura del pulso; DP=duración del pulso.

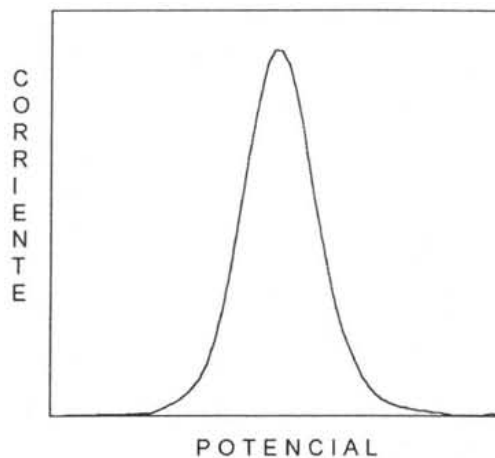


Figura 8. Señal típica de I vs E en polarografía diferencial de pulsos.

Desde el nacimiento de una gota a $t=0$ hasta la aplicación del pulso a $t=\tau'$ se impone el potencial base. A tiempos posteriores, el potencial es $E+\Delta E$. Cada gota nace en con la composición del seno de la solución, pero ocurre la electrólisis durante el periodo antes de τ' . Entonces el pulso opera sobre los perfiles de concentración que la electrólisis crea previamente.

La altura del pico está dada por la *ecuación 3*:

$$(\delta i)_{\text{máx}} = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0^* (1-\sigma)}{\pi^{1/2} (\tau-\tau')^{1/2} (1+\sigma)} \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde σ se define como:

$$\sigma = \exp[(nF/RT)*(\Delta E/2)] \quad (\text{ecuación 4})$$

Considerando ΔE como la altura del pulso (AP).

Ya que la corriente faradaica medida con esta técnica nunca es mayor que la medida en la técnica de pulso normal, la ganancia en sensibilidad del método diferencial no proviene de la respuesta de la corriente faradaica, sino de la menor contribución de la corriente capacitiva. Si ésta no cambia mucho del primer muestreo de corriente al segundo, el proceso de sustracción que origina el $\delta(i)$ tiende a cancelar la contribución de la corriente capacitiva. Con esta técnica se han logrado límites de detección del orden de 10^{-8} M [8].

4.4.4 Cronoamperometría de pulso directo

Como se aprecia en la Figura 9, esta técnica consiste en la aplicación de un pulso de potencial al electrodo de trabajo, durante un periodo de tiempo T_1 desde un valor en el que no ocurre reacción faradaica (PI) a un potencial E_1 en el que la concentración de la especie electroactiva en la superficie del electrodo llega a ser cero. Esta técnica emplea un electrodo de trabajo estacionario y la solución se mantiene sin agitación [6].

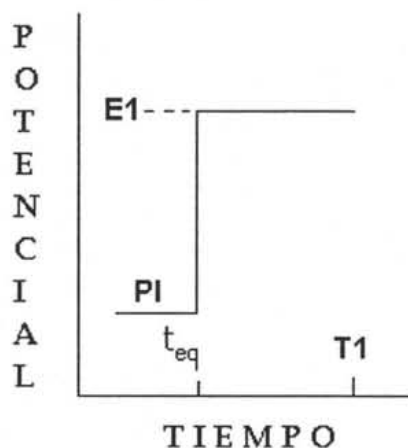


Figura 9. Perturbación de potencial en función del tiempo para cronoamperometría de pulso directo. PI=potencial inicial; E1=potencial del pulso; T1=tiempo de pulso; t_{eq} =tiempo de equilibrio.

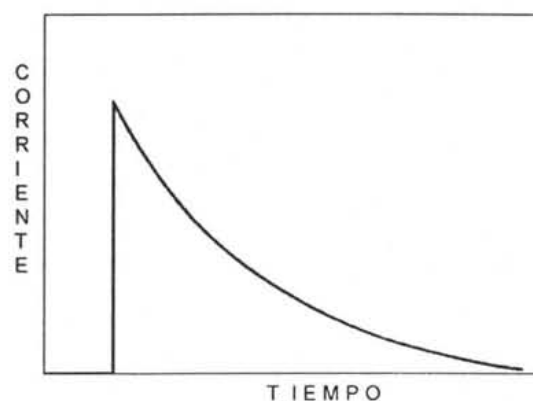


Figura 10. Señal típica de I vs t obtenida en cronoamperometría de pulso directo.

La respuesta que se monitorea es la corriente en función del tiempo (Figura 10). Como el transporte de masa bajo estas condiciones es sólo por difusión, la curva corriente vs tiempo refleja el cambio en el gradiente de concentración en la cercanía de la superficie del electrodo. Ello involucra una expansión gradual de la capa de difusión asociada con la disminución del reactivo y con esto, una disminución en la pendiente de los perfiles de concentración con el incremento del tiempo, como se muestra en la Figura 11.

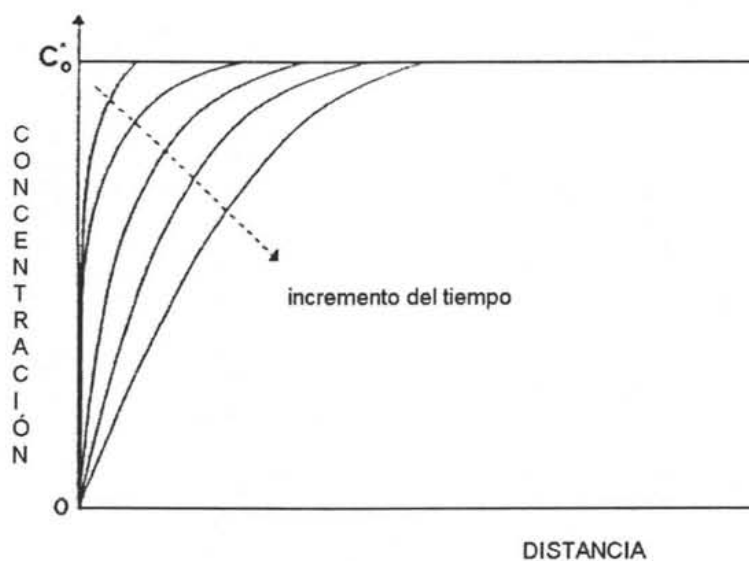


Figura 11. Cambio en los perfiles de concentración conforme el tiempo aumenta en cronoamperometría de pulso directo [6].

La corriente del sistema, para un electrodo plano, está dada por la ecuación de Cottrell (*ecuación 5*). Para un electrodo esférico, se considera un término adicional que considera la difusión esférica.

$$I_{(\tau)} = nFAD_0C_0^* \left[\frac{1}{(\pi D_0 \tau)^{1/2}} + \frac{1}{r} \right] \quad (\text{ecuación 5})$$

Generalmente, esta técnica se emplea para medir los coeficientes de difusión de las especies electroactivas, o bien, el área del electrodo de trabajo. Las aplicaciones analíticas de la técnica, por ejemplo en análisis *in vivo*, consisten en la aplicación repetida de pulsos de potencial al electrodo de trabajo a intervalos de tiempo fijos. Otra de sus aplicaciones se encuentra en el estudio de mecanismos de procesos de electrodo, para lo cual se emplean experimentos de doble pulso. En este caso, el segundo pulso se emplea para investigar el destino de las especies generadas durante el primer pulso [6].

4.5 Glutación

4.5.1 Glutación y su relación con el estrés oxidativo

Como se ha mencionado anteriormente, se conoce como estrés oxidativo a la alteración en el equilibrio de la producción de especies reactivas de oxígeno. Dichas especies son generadas durante el metabolismo oxidativo en las células de los seres vivos. El exceso en la producción de estas moléculas puede dañar potencialmente a diferentes macromoléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, conduciendo a la degeneración celular. Para contrarrestar esto, las células mantienen una batería de enzimas detoxificantes y pequeñas moléculas antioxidantes, dentro de las cuales se encuentra el glutatión (Tabla 1).

Tabla 1. Breve lista de moléculas y enzimas antioxidantes presentes en las células

Moléculas antioxidantes	Enzimas antioxidantes
Glutatión	Catalasa
Ácido ascórbico	Superoxido dismutasa
Ácido úrico	Glutation peroxidasa
Ácido lipoico	Glutatión-S-transferasa
α -Tocoferol	GSSG reductasa
Ubiquinol	Enzimas reparadoras (DNAasas, RNAasas, etc)
Carotenoides	Tioredoxin reductasa
Flavonoides	

4.5.2 Generalidades del glutatión

El tripéptido glutatión (γ -L-glutamil-L-cistein-glicina, Figura 12) es el tiol intracelular no proteico más abundante en las células de los mamíferos. Se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina, mediante la acción de las enzimas γ GluCys-sintetasa y glutatión-sintetasa. Funciona principalmente como antioxidante, eliminando las especies reactivas de oxígeno. Otras de sus funciones incluyen el mantener el potencial redox en las células mediante la reducción del grupo tiol de las proteínas, el transporte y almacenamiento de cisteína y como un cofactor en ciertas reacciones de isomerización. Investigaciones recientes sugieren que el GSH puede tener algún papel en la transducción de señales, en la proliferación celular, en la regulación de la expresión de genes y en la apoptosis [1,3,9]. Aunado a lo anterior, el GSH juega un papel importante en otros procesos celulares, como el metabolismo del DNA, la síntesis de proteínas, la activación de ciertas enzimas y el incremento de la función inmunológica [9].

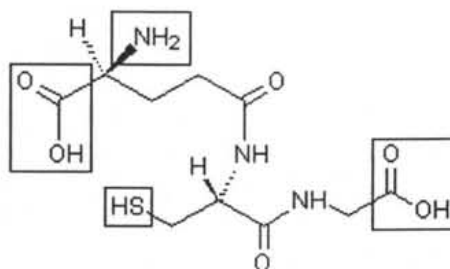
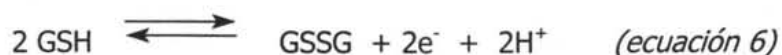


Figura 12. Estructura del glutatión (GSH). En los recuadros se muestran las funciones con propiedades ácido-base

Como agente reductor, el GSH se oxida reversiblemente formando un puente disulfuro entre dos moléculas:



En organismos vivos, la oxidación es catalizada por varias enzimas, una de ellas es la glutatión peroxidasa (GSH-Px) dependiente de selenio, mientras que la reducción es catalizada por la glutatión reductasa. En la Tabla 2 se enlistan algunas enzimas que emplean el glutatión como sustrato, con el fin de que las especies reactivas de oxígeno puedan ser eliminadas de las células [9]:

Tabla 2. Enzimas que utilizan GSH como sustrato

Enzima
Glutatión peroxidasa $2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ GSH} + \text{LOOH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{LOH} + \text{H}_2\text{O}$
Glutatión transferasa $2 \text{ GSH} + \text{LOOH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{L(OH)}_2 + \text{H}_2\text{O}$
Fosfolípido peróxido-glutatión peroxidasa $2 \text{ GSH} + \text{ROOH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$
Glutatión reductasa $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+$
LOOH = peróxidos orgánicos ROOH = fosfolípido, colesterol, colesterol hidroperóxido

4.5.3 Regulación de los niveles de GSH

Durante la eliminación de las especies reactivas de oxígeno, el GSH está involucrado en dos tipos de reacciones:

- reacciones no enzimáticas en las que participan radicales como el superóxido, óxido nítrico o hidroxilo

- reacciones en donde actúa como donador de electrones para la reducción de los peróxidos en la reacción con la glutatión peroxidasa.

Aunado a lo anterior, se ha observado que los niveles celulares de glutatión se ven disminuidos por alguno de los siguientes mecanismos:

- cuando es consumido durante la formación de GSH-S-conjugados mediante la glutatión-S-transferasa (GST);
- por conversión a GSSG mediante la glutatión peroxidasa (GPx); ó
- por la liberación del GSH fuera de la célula a través de la membrana celular [9].

En la Figura 13 se muestra una representación de las diferentes rutas involucradas en el metabolismo del glutatión en sistemas vivos y su regeneración por medio del NADPH.

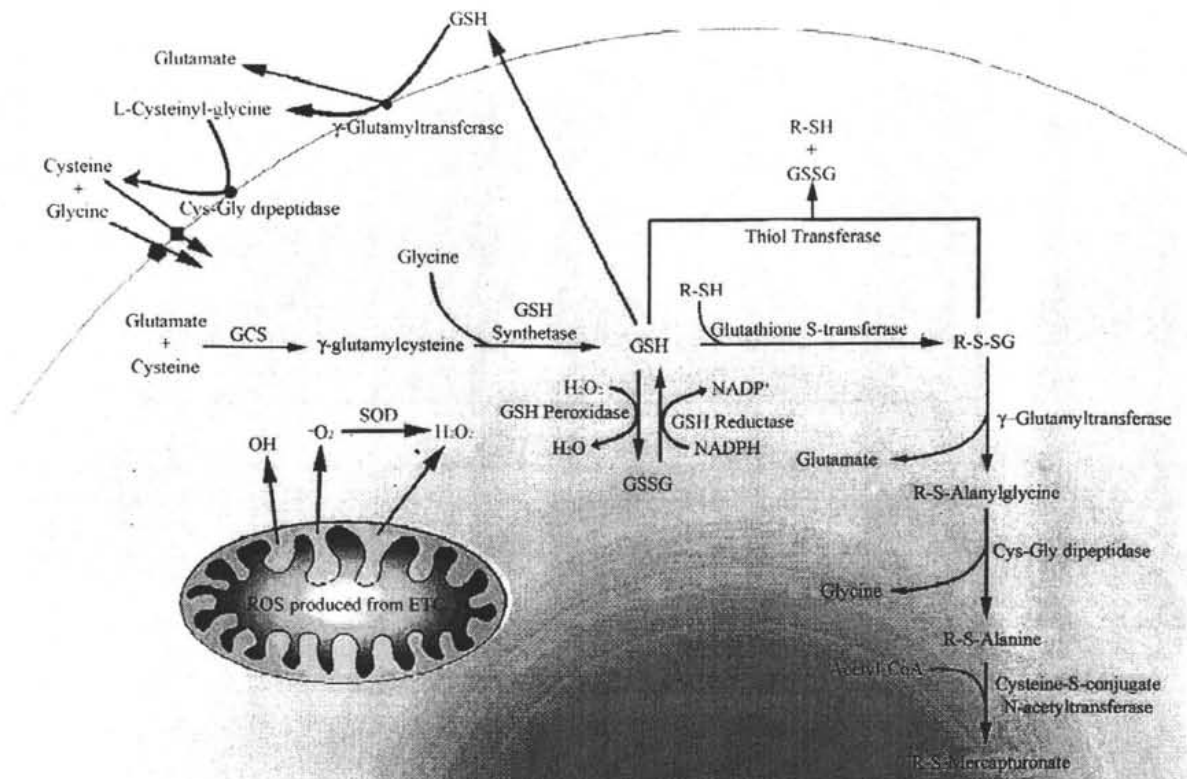


Figura 13. Representación esquemática de las distintas trayectorias involucradas en el metabolismo del glutatión [9].

4.5.4 Glutación en el cerebro

Se ha reportado que el contenido de glutación en el cerebro de rata de la cepa Wistar va desde 1.6 hasta 51.9 nmol/mg proteína [11-21], mientras que en el cerebro de ratones va de 14 a 54 nmol/mg proteína [3,54,55]. Asimismo, en cultivos de neuronas de mamíferos el contenido de éste es alrededor de 40 nmol/mg proteína [1]. Se encontró también que la disminución en el contenido de GSH celular es dependiente de la edad, esto para muchos organismos, incluyendo los seres humanos. Los estudios han demostrado que los ratones maduros, en comparación con los jóvenes, presentan una disminución del 30% en los niveles de GSH [9].

Comparado con otros órganos el cerebro es más susceptible al daño oxidativo debido a varios factores, entre los cuales están la demanda alta de oxígeno, el aumento en el contenido de hierro, la presencia de ácidos grasos insaturados que son blancos para la peroxidación de lípidos y la disminución de la actividad de enzimas detoxificantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutación reductasa. Durante el proceso del metabolismo aerobio celular las fuentes de especies reactivas de oxígeno son las mitocondrias así como el metabolismo del ácido araquidónico y las enzimas óxido nítrico-sintasa, xantina-oxidasa y monoamina-oxidasa [9].

Ya que el cerebro necesita una eliminación intensa de las especies reactivas de oxígeno, es evidente que la disminución en el contenido de GSH podría aumentar el daño oxidativo, haciendo al cerebro más susceptible a los desórdenes neurológicos.

4.5.5 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, afectando aproximadamente el 1% de la población humana de 65 años en adelante. Este desorden neurodegenerativo se manifiesta clínicamente por una disminución en la funciones motora y cognitiva, además de depresión. Fisiológicamente, la enfermedad de

Parkinson se caracteriza por la deficiencia de dopamina, ocasionada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra compacta del cerebro (SNpc) [9].

Las neuronas de la sustancia negra contienen neuromelanina, que puede enlazar hierro e iniciar su reacción con el H_2O_2 mediante la "reacción de Fenton" para formar el radical hidroxilo altamente reactivo. A su vez, esta especie puede extraer hidrógenos metilénicos de grasas poliinsaturadas de los fosfolípidos de la membrana de las neuronas, iniciando la peroxidación de lípidos y con ello la muerte celular [9].

4.5.6 Glutación y la enfermedad de Parkinson

En general, la sustancia negra del cerebro de los organismos presenta niveles más bajos de GSH comparada con otras regiones del cerebro, de acuerdo al siguiente orden: corteza > cerebelo > hipocampo > estriato > sustancia negra. Esta tendencia es la misma a lo largo del periodo de vida, que aumenta durante el crecimiento, alcanza un valor máximo en la etapa de madurez y disminuye un 30% durante el envejecimiento. Se ha observado que durante la enfermedad de Parkinson hay una disminución de los niveles de GSH, siendo el primer indicador del estrés oxidativo durante el progreso de la enfermedad [9].

4.5.7 Glutación y la *diabetes mellitus*

La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por una hiperglucemia y la insuficiencia en la secreción o acción de la insulina endógena. Existe evidencia de que la diabetes está asociada con el estrés oxidativo debido a que durante esta enfermedad hay un incremento en la concentración de radicales libres, que se forman a través de la oxidación de la glucosa, la glicación no enzimática de las proteínas y la consecuente oxidación de éstas. Aunado a esto, las especies reactivas de oxígeno pueden participar en varias de las complicaciones secundarias de la diabetes, como son la nefropatía, la retinopatía y la neuropatía [22-26].

4.6 Validación de los métodos analíticos

La definición dada por la ISO para validación es: "confirmación por medio de examen y presentación de evidencia objetiva de que se satisfacen los requisitos particulares para un uso específico" [28]. Puede interpretarse como el proceso de definición de un requisito analítico y la confirmación de que el método considerado posee las características de desempeño que requiere la aplicación.

Asimismo, la definición para validación de métodos dada por la ISO es: "el proceso de establecimiento de las características de desempeño y las limitaciones de un método, así como la identificación de los factores que pueden cambiar dichas características" [28].

La validación de un método se realiza cuando es necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para la aplicación a un problema analítico particular, por ejemplo:

- Cuando se desarrolla un método nuevo para un problema particular
- Cuando se hacen implementos a un método establecido
- Cuando el control de calidad indica que un método está cambiando con el tiempo
- Cuando un método establecido se emplea en un laboratorio diferente, con distintos analistas o distintos equipos
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo un método nuevo y un estándar

Es importante mencionar que en el proceso de validación de métodos, los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan empleando equipos que trabajan satisfactoriamente, que cumplen con especificaciones y que están calibrados correctamente.

Los principales parámetros de desempeño de un método que deben evaluarse, según EURACHEM, son los siguientes [29]:

4.6.1 Confirmación de la identidad

En general, se considera que los métodos analíticos consisten en una etapa de medición que puede o no ser precedida por una etapa de aislamiento. Es necesario establecer que la señal atribuible al analito, producida en la etapa de medición, se debe solamente a dicho analito y no a la presencia de otra especie química, o más aún, que se deba a la casualidad. A esto se llama confirmación de la identidad, la cual dependerá de la efectividad de la etapa de aislamiento y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición, así como de la interferencia de otros compuestos con la determinación del analito.

4.6.2 Selectividad/especificidad

La selectividad y la especificidad son parámetros que evalúan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. La selectividad se define como "la habilidad del método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz de la muestra, bajo las condiciones establecidas para el método" [30]. Mientras que la especificidad se define como "la habilidad de un método para medir únicamente lo que se tiene propuesto medir" [31].

Existen casos en los que las interferencias químicas pueden identificarse mediante un método en particular, aunque la probabilidad de encontrarlas en la práctica sea muy baja. El analista debe decidir cuando sea razonable detener la búsqueda de interferencias. Estos parámetros se aplican tanto al análisis cualitativo como cuantitativo.

Si están presentes interferencias que no puedan separarse del analito de interés o si el analista no tiene conocimiento de su existencia, entonces éstas tendrán una variedad de efectos. Dependiendo de cómo se establece la identidad del analito, las interferencias pueden distorsionar la señal procedente del analito, o bien contribuir a aumentar o disminuir la intensidad de dicha señal.

4.6.3 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección se define como "la concentración más baja de analito que puede ser medida con certeza estadística razonable" [31]. Cuando las mediciones se realizan con niveles bajos del analito o de las propiedades, por ejemplo en el análisis de trazas, es importante conocer cuál es la concentración mínima o el valor más bajo de la propiedad que puede detectarse de manera confiable con el método. El término "límite de detección" no es aceptado de forma general; la ISO considera que es el "valor mínimo detectable de la variable neta de estado", lo que en química se traduce como "concentración neta mínima detectable", mientras que la IUPAC prefiere la expresión "valor verdadero mínimo detectable".

Para fines de validación, es suficiente proporcionar una indicación del nivel en el cual la detección se hace incierta. A ese respecto, por lo general, es suficiente la aproximación de considerar el valor medido del blanco más tres veces la desviación estándar del promedio del blanco ($\text{blanco} + 3\sigma$). Cuando se especifica un límite de detección es indispensable que el analista haga referencia al método empleado para su determinación.

Debe tenerse en cuenta que tanto el promedio como la desviación estándar del blanco de muestra dependen de la matriz de dicho blanco. Por lo tanto, el límite de detección depende de la matriz. Cuando estos criterios se emplean para tomar decisiones importantes, la determinación de los valores relevantes de precisión debe repetirse con regularidad, al igual que las características de desempeño del método.

El límite de cuantificación se define como "la concentración más baja del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas para el método" [30]. También se define por diversos convenios como la concentración del analito que corresponde al valor del blanco de muestra más 5, 6 o 10 veces el valor de la desviación estándar del promedio del blanco. Debe tenerse presente que ninguno de los dos límites mencionados representan niveles por debajo de los cuales la cuantificación es imposible. Simplemente sucede que la magnitud de la incertidumbre asociada se hace comparable al resultado medido en la región del límite de detección.

4.6.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal

En cualquier método cuantitativo, es necesario determinar el intervalo de concentraciones analíticas medibles o los valores de las propiedades en las que el método puede utilizarse. En el valor mínimo del intervalo de concentraciones, el factor limitante es el valor del límite de detección y/o cuantificación. En el valor máximo del intervalo, las limitaciones quedan impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, en el cual la señal de respuesta depende linealmente de la concentración del analito o del valor de la propiedad. La amplitud de este intervalo se establece durante la evaluación del intervalo de trabajo, para lo cual una inspección visual de la curva y de los residuales puede ser suficiente. Sin embargo, pruebas objetivas tales como la de "calidad del ajuste" son aún mejores. Es recomendable que las verificaciones de linealidad presenten al menos 10 puntos de diferente concentración o de valor de la propiedad.

Dentro del intervalo lineal, un punto de calibración puede ser suficiente para establecer la pendiente de la curva de calibración. Sin embargo, en el resto del intervalo de trabajo se requerirá de una calibración con múltiples puntos (de preferencia más de 6). La relación

entre la respuesta del instrumento y la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que un método sea eficaz, pero la curva sí debe presentar linealidad día tras día. Es importante notar que el intervalo de trabajo y el intervalo lineal pueden variar de una matriz a otra, dependiendo del efecto de las interferencias que proceden de las mismas [29].

4.6.5 Exactitud

Se define como "la cercanía en la concordancia de un resultado con un valor de referencia aceptado" [32]. La validación de un método busca cuantificar la exactitud de los resultados mediante la evaluación de efectos sistemáticos y aleatorios sobre dichos resultados. Por lo tanto se estudian los dos componentes de la exactitud: la veracidad y la precisión. La veracidad expresa la cercanía del promedio de un conjunto de resultados con respecto a un valor de referencia; para evaluarla se conocen dos técnicas: (a) por comparación con un material caracterizado con valores de referencia o (b) por comparación con otro método caracterizado. Por otro lado, la precisión es una medida de qué tan cercanos son los resultados entre sí; generalmente se expresa en términos de desviación estándar. Una expresión cada vez más común de la exactitud es la incertidumbre de medición.

4.6.6 Incertidumbre de medición

Se define como "el parámetro asociado con el resultado de una medición, el cual caracteriza la dispersión de los valores que puede atribuirse a la propiedad medida" [33]. El parámetro puede ser la desviación estándar o el ancho de un intervalo de confianza. La estimación de la incertidumbre de medición toma en cuenta todos los efectos conocidos que influyen en el resultado.

En química analítica, la estimación de la incertidumbre debe tomar en consideración:

- La precisión total a largo plazo del método
- El sesgo y su incertidumbre, incluyendo tanto la incertidumbre estadística involucrada en las mediciones del sesgo como la incertidumbre del material de referencia o del método
- Las incertidumbres de calibración, que sólo requieren ser verificados. Lo anterior debido a que la mayoría de las incertidumbres de calibración asociadas a los equipos son insignificantes en comparación con la precisión total y la incertidumbre sobre el sesgo
- Además de los anteriores, cualquier otro efecto significativo. Por ejemplo cuando los intervalos de temperatura o de tiempo permitidos por el método no hubieran sido examinados con detalle en los estudios de validación y pudiera ser necesario tomar en cuenta su efecto.

Cuando sea importante la contribución de efectos individuales, por ejemplo en los laboratorios de calibración, será necesario considerar por separado las contribuciones individuales de todos los efectos. Sin embargo, una discusión detallada sobre la incertidumbre rebasa el alcance de este trabajo.

4.6.7 Sensibilidad

Se define como "el cambio en la respuesta del instrumento de medida que corresponde a un cambio en la concentración del analito" [33], es decir, es el gradiente de la curva de respuesta. La sensibilidad es un parámetro que vale la pena calcular y emplear en fórmulas de cuantificación cuando se ha establecido que la respuesta del instrumento en función de la concentración es lineal, y cuando se ha determinado también la ordenada al origen de la curva de respuesta.

4.6.8 Recuperación

Los métodos analíticos no siempre miden la totalidad del analito de interés presente en la muestra. Los analitos pueden estar presentes en las muestras en varias formas y no todas son de interés para el analista. Por lo anterior, el método puede diseñarse intencionalmente para determinar sólo una forma particular del analito. Sin embargo, la imposibilidad para determinar la totalidad del analito presente puede indicar un problema inherente en el método. De cualquier modo, es necesario evaluar la eficiencia del método para detectar la totalidad del analito presente y evidenciar de esta forma la eficiencia del método.

Generalmente, dado que no se conoce la cantidad de un analito en particular que se encuentra en una porción de prueba, es difícil tener la certeza del éxito del método para extraer dicho analito de la matriz. Una opción para determinar la eficiencia de la extracción consiste en incorporar el analito en porciones de prueba a varias concentraciones, después extraerlo de dichas porciones de prueba fortificadas y determinar la concentración del analito en cada una de ellas.

El problema inherente con esta práctica es que el analito que se introduce de esta forma probablemente no se encuentra retenido con la misma fuerza que el que se encuentra presente naturalmente en la matriz de la porción de prueba. Por lo anterior, la técnica dará una idea exagerada de la eficiencia de la extracción. Esta es la forma más común para determinar la eficiencia de la recuperación, se reconoce como una manera aceptable de hacerlo, aunque debe tenerse presente el inconveniente de la técnica.

Una alternativa al método anterior, consiste en efectuar los estudios con materiales de referencia apropiados (cuando se dispone de ellos), siempre que éstos se hayan obtenido por caracterización de materiales naturales, en lugar de sintéticos, en los que el analito haya sido incorporado [29].

4.6.9 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico se define como "la medida de su capacidad para permanecer invariable frente a pequeñas variaciones en los parámetros del método. A su vez, provee un índice de la confiabilidad del método para ser empleado durante su uso normal" [34]. En cualquier método analítico habrá ciertas etapas que si no son realizadas con suficiente cuidado, tendrán un efecto notable sobre el desempeño del método, y aún más, podrían ocasionar que el método no funcionara. Estas etapas deberían ser identificadas como parte del desarrollo del método empleando "pruebas de robustez", las cuales involucran variaciones en el método hechas a propósito con el fin de investigar su efecto sobre el desempeño del mismo. De esta forma es posible identificar las variables que tienen un mayor efecto sobre el desempeño del método, para con ello asegurar que están controladas de manera efectiva.

Por otro lado, cuando se requiera mejorar el método, es probable que se logre si el analista se enfoca sobre aquellas etapas que se han encontrado como críticas. Generalmente, la robustez de un método es evaluada por el laboratorio de origen, antes de colaborar con otros laboratorios. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar el efecto ya sea sobre la precisión o la exactitud del método [29].

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El trabajo se desarrolló en las siguientes etapas experimentales:

- Optimización de las variables polarográficas del método de polarografía de pulso normal.
- Evaluación de los parámetros de desempeño del método.
- Cuantificación del GSH en homogenizados de cerebro de rata Wistar, comparando con un método espectrofotométrico.

5.1 Equipo, materiales y reactivos

Equipo

- Potenciostato EG&G PARC modelo 273A
- Electrodo de mercurio EG&G PARC modelo 303A, trabajando en el modo de electrodo de gota pendiente (HMDE) y electrodo goteante (DME), equipado con un electrodo de referencia de Ag/AgCl con separador de membrana iónica (vycor) y electrodo auxiliar de alambre de platino
- Centrífuga Fisher Scientific modelo 228
- Centrífuga Eppendorf modelo 5415R
- Espectrofotómetro Shimadzu modelo UV160U
- pHmetro Thermo-Orion modelo 420
- Balanza analítica OHAUS modelo Explorer

Materiales

- Material volumétrico calibrado clase A
- Micropipetas de volumen variable Gilson
- Taladro BOSCH modelo Magnum, equipado con un pistilo de teflón
- Reóstato Equipar

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos usados en este trabajo fueron adquiridos de la compañía Aldrich, a menos que se indique el fabricante.

- L-Glutatión reducido, GSH, 98% ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$)
- L-Cisteína, 99% ($C_3H_7NO_2S$)
- N-Acetil-L-cisteína, 99% ($C_5H_9NO_3S$)
- Nitrato de plomo (II), 99.999% ($Pb(NO_3)_2$)
- Acetato de sodio, 98% (CH_3COONa)
- Fosfato monoácido de sodio, 99% (Na_2HPO_4)
- Carbonato de sodio, 98% (Na_2CO_3)
- Cloruro de potasio, 99.9% (KCl)
- Fosfato diácido de potasio, 99.7% (KH_2PO_4). Mallinckrodt
- Cloruro de sodio, 99.8% (NaCl). Fermnt
- Ácido metafosfórico sólido, 36.5% (HPO_3)
- Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), DTNB, 99% ($[-SC_6H_3(NO_2)CO_2H]_2$)
- Tris (hidroximetil)aminometano, TRIS, 99.9% ($NH_2C(CH_2OH)_3$)
- Citrato de sodio tribásico dihidratado, 99% ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2 \cdot 2H_2O$)
- Tartrato de sodio potasio tetrahidratado, 99% ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado, 100.8% ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Baker
- Albúmina bovina, 96%
- Reactivo de Folín (fenol de Folín-Ciocalteu)
- Hidróxido de sodio 98% (NaOH)
- Ácido nítrico (HNO_3)
- Soluciones amortiguadoras calibradas de pH 4, 7 y 10. Orion
- Agua desionizada en un equipo Milli-Q, con una resistividad de 18.2 M Ω cm
- Nitrógeno gas, 99.999% (N_2). AGA

- Solución estándar de GSH 0.025 M. Se pesaron 0.0077 g de GSH, se disolvieron en el amortiguador Dulbecco y se aforó a 1 mL. Esta solución se preparó el día que se iba a ocupar y se mantuvo en refrigeración para evitar la oxidación del GSH.
- Amortiguador de fosfatos Dulbecco, pH 7.4, 9.5 mM. Se pesaron 0.1 g de KCl, 0.1 g de KH_2PO_4 , 4g de NaCl y 0.57 g de Na_2HPO_4 , se mezclaron y disolvieron en agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 con HNO_3 1 M y se aforó a 500 mL [35].
- Solución de cisteína 0.025 M. Se pesaron 0.0031 g de cisteína, se disolvieron en una mezcla 1:1 de amortiguador de fosfatos Dulbecco y HPO_3 al 10% p/v, y se aforó a 1 mL.
- Solución de N-acetilcisteína 0.025 M. Se pesaron 0.0041 g de N-acetilcisteína, se disolvieron en una mezcla 1:1 de amortiguador de fosfatos Dulbecco y HPO_3 al 10% p/v, y se aforó a 1 mL.
- Solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.001 M,. Se pesaron con precisión 0.0331 g de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, se disolvieron en un amortiguador de acetatos 0.1 M de pH 5 y se aforó a 100 mL.
- Amortiguadores de pH 4, 5 y 6, de concentración 0.1 M. Se pesaron 0.41 g de CH_3COONa , se disolvieron con agua desionizada, se ajustó al pH deseado con HNO_3 1 M y se aforó a 50 mL.
- Amortiguadores de pH 6.5, 7 y 8 de concentración 0.1M. Se pesaron 0.71 g de Na_2HPO_4 , se disolvieron en agua desionizada, se ajustó al pH deseado con HNO_3 1 M y se aforó a 50 mL.
- Amortiguadores de pH 9 y 10. Se pesaron 0.53 g de Na_2CO_3 , se disolvieron en agua desionizada, se ajustó al pH deseado con HNO_3 1 M y se aforó a 50 mL.

- Amortiguador TRIS, pH 8.5, 0.4M. se pesaron 24.22 g de TRIS, se disolvieron en agua desionizada, se ajustó el pH a 8.5 con HNO₃ 1M y se aforó a 500 mL.
- Reactivo de Ellman. Se pesaron 0.020 g de DTNB, se disolvieron en citrato de sodio al 1% y se aforó a 50 mL. Esta solución se preparó el día del experimento y sólo la cantidad requerida, ya que el sobrante se desecha.
- Solución de HPO₃ 10% p/v. Se pesaron 27.3973 g de HPO₃, se disolvieron en agua desionizada y se aforó a 100 mL.

5.2 Preparación del homogenizado de cerebro de rata

Se emplearon ratas hembras albinas de la cepa Wistar, maduras sexualmente. Estas ratas fueron proporcionadas por el Instituto de Fisiología Celular–UNAM. Los animales empleados estuvieron en el intervalo de 3 a 6 meses de edad y pesaron de 250 a 300 gramos. Estos roedores fueron mantenidas con acceso libre de agua y alimento.

La rata se sacrificó por dislocación cervical bajo anestesia con éter y una vez muerta, el cerebro fue extirpado y mantenido en una solución de NaCl al 0.9%, en hielo. Posteriormente, el cerebro se pesó y homogenizó mecánicamente durante un minuto en un amortiguador de fosfatos Dulbecco pH 7.4, considerando la relación de 2.5 mL de buffer por cada gramo de cerebro húmedo. El homogenizado se centrifugó a 3,400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y seco.

5.2.1 Preparación del homogenizado para la aplicación del método espectrofotométrico

Se tomaron por duplicado 200 μL del sobrenadante descrito en la sección anterior. Se agregaron 200 μL de HPO_3 al 5% y se dejó incubando en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10,000, rpm a 4°C durante 10 minutos. Una vez recuperado el sobrenadante, se tomó una alícuota de 300 μL y se le agregó 1.5 mL de amortiguador TRIS pH 8.5 y 1.8 mL de reactivo Ellman, y se agitó vigorosamente. El pH final de esta solución fue 8, ésta se transfirió a una celda espectrofotométrica para medir la absorbancia a 412 nm en los primeros 5 minutos de reacción [36].

5.2.2 Preparación del homogenizado para la aplicación de los métodos polarográficos

Una vez que se tomó la alícuota de sobrenadante para el método espectrofotométrico, se midió el volumen de sobrenadante restante y se le agregó la misma cantidad de HPO_3 al 10%. Se dejó incubando en hielo durante 30 minutos y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante.

En una celda de trabajo se colocaron 1550 μL de la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10% junto con 0.16g de NaOH. Una vez disuelto el NaOH, se agregaron 1.8 mL del sobrenadante y la celda se colocó en el electrodo, el pH final de esta solución fue 6.7. La solución se desoxigenó con burbujeo de nitrógeno durante 10 minutos, para realizar entonces la determinación electroquímica.

Cabe mencionar que la manipulación del cerebro debe hacerse lo más rápido posible y en frío, con el fin de evitar la oxidación del GSH por el oxígeno del aire. Una vez obtenido el sobrenadante final, se mantuvo a -71°C hasta la realización del estudio electroquímico. Estos estudios se realizaron en un lapso máximo de 5 horas después del sacrificio de la rata (Ver **Anexo 1**).

5.3 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Para estandarizar la concentración de GSH en relación a la cantidad de proteínas en cada cerebro, se realizó la cuantificación de éstas por el método de Lowry [37]. Como primer paso, se construyó una curva de calibración de albúmina, para lo cual se preparó una solución estándar de albúmina de concentración 1.5 mg/mL en agua desionizada. Se tomaron distintas alícuotas de esta solución estándar para obtener un volumen final de 400 μ L de soluciones de albúmina de distinta concentración en agua y a través de una serie de diluciones se obtuvieron soluciones en el intervalo de concentración de 0 a 80 μ g/mL (ver **Anexo 2**). Las soluciones se dejaron reposar durante 10 minutos, pasado este tiempo se agregó 0.3 mL del reactivo de Folín disuelto en agua desionizada (1:1) y se dejó incubar por 30 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm.

Para determinar el contenido de proteínas en la muestra biológica, se tomaron 10 μ L del sobrenadante obtenido en la sección 4.8 y se mezclaron con 390 μ L de agua desionizada. Se agregaron 2.3 mL de la mezcla de Na_2CO_3 , CuSO_4 y tartrato de sodio potasio descrita en el **Anexo 2**. Posteriormente se agregaron 0.3 mL del reactivo de Folín y pasados los 30 minutos se midió la absorbancia a 550 nm. La lectura de absorbancia se interpoló en la curva de calibración obtenida previamente.

5.4 Efecto del tamaño de la gota de mercurio

En una celda electroquímica se prepararon 4 mL de una solución de GSH 8×10^{-4} M en el amortiguador Dulbecco 9.5 mM pH 7.4. Se llevó a cabo la determinación del GSH variando el área de la gota de mercurio y bajo las condiciones seleccionadas para la polarografía de pulso normal. De igual forma se realizó esta determinación para la técnica de cronoamperometría, con los programas de potencial descritos en las Tablas 3 y 4. El área de la gota de mercurio se varió de acuerdo a la clasificación con que cuenta el electrodo: gota chica (0.008 cm^2); gota mediana (0.014 cm^2) y gota grande (0.046 cm^2), donde las

áreas se determinaron experimentalmente en función del peso de un número determinado de gotas.

Tabla 3. Programa de potencial para los experimentos de polarografía de pulso normal

	P. pulso normal
Incremento del barrido (mV)	4
Tiempo de goteo (seg)	0.8
Velocidad de barrido (mV/seg)	5
Ancho del pulso (seg)	0.2

NOTA: Los valores empleados de **potencial inicial** y **final** están especificados en cada uno de los pies de figura de las gráficas de la sección "Análisis de resultados", esto debido a que dichos valores variaron para algunos experimentos.

Tabla 4. Programa de potencial para los experimentos de cronoamperometría

	Cronoamperometría
Potencial inicial (V)	-0.3
Potencial del pulso (V)	0.1
Duración del pulso (seg)	1
No. puntos	210
Tiempo por punto (seg)	0.005

5.5 Optimización de las variables propias de la polarografía de pulso normal

En el seno de la celda de trabajo se prepararon 4 mL de una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en amortiguador de pH 6.5, a partir de una alícuota del estándar de GSH 0.025 M. La solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la determinación del GSH, aplicando el siguiente programa de potencial:

Potencial inicial: -0.4 V vs Ag/AgCl

Potencial final: 0.1 V vs Ag/AgCl

Incremento del barrido: 6 mV

Tiempo de goteo: 1.2 s

Velocidad de barrido: 5 mV/s

Duración del pulso: 0.05 s

A partir de este programa se variaron los parámetros que se observan en la Figura 14; asimismo se describe la metodología empleada para realizar dicho estudio:

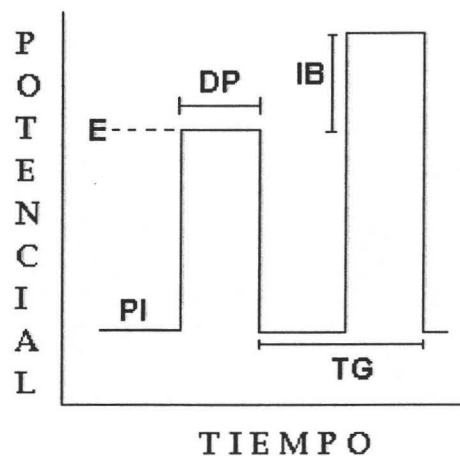


Figura 14. Perturbación de potencial en función del tiempo para polarografía de pulso normal. IB=incremento del barrido; TG=tiempo de goteo; DP=duración del pulso.

5.5.1 Incremento del barrido

Se modificó a $2, 8, 14$ y 18 mV , manteniendo constantes el resto de los parámetros, a excepción del tiempo de goteo, ya que varía al mantener constante la velocidad de barrido. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

5.5.2 Tiempo de goteo

Se modificó a 0.4, 0.8, 1 y 2 segundos, manteniendo constantes el resto de los parámetros, a excepción de la velocidad de barrido, que se modifica directamente al variar el tiempo de goteo. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

5.5.3 Ancho del pulso

Se modificó a 0.03, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15 y 0.2 segundos, manteniendo constantes el resto de los parámetros. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

5.6 Compensación de la caída óhmica

En una celda de trabajo se prepararon 4 mL de una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en amortiguador de pH 6.5, a partir de una alícuota de estándar de GSH 0.025 M. La solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos. Posteriormente se determinó la resistencia no compensada de la solución mediante la técnica llamada compensación de IR por retroalimentación positiva, aplicando el siguiente programa de potencial:

Altura del pulso: 20 mV

Nivel de compensación: 90%

Oscilación: 5%

Potencial de medida: -0.4 V vs Ag/AgCl

Intervalo de corriente: 10 μ A

Una vez encontrado el valor de la resistencia, se realizó la determinación electroquímica del GSH mediante voltamperometría cíclica, incluyendo o no el valor de la resistencia no compensada de la solución. Se aplicó el programa de potencial descrito en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de potencial para los experimentos de voltamperometría cíclica

	Voltamperometría cíclica
Potencial inicial (V)	-0.5
Potencial de inversión (V)	0.3
Incremento del barrido (mV)	2
Duración del pulso (s)	0.04
Velocidad de barrido (mV/s)	50
Resistencia no compensada (Ω)	212

5.7 Efecto de la velocidad de barrido en el sistema del GSH

En una celda de trabajo se prepararon 4 mL de una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en amortiguador de pH 6.5, a partir de una alícuota de estándar de GSH 0.025 M. La solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos. Posteriormente se estudió la señal del GSH por voltamperometría cíclica variando la velocidad de barrido a 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mV/s aplicando el programa de potencial descrito en la Tabla 5.

5.8 Desplazamiento de las señales del GSH en función del pH en voltamperometría cíclica y polarografía de pulso normal

En una celda de trabajo se prepararon 4 mL de una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en los amortiguadores de pH 4 a 10, a partir de una alícuota de estándar de GSH 0.025 M. La solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos. Posteriormente se estudió la señal del GSH a los distintos valores de pH de la solución, aplicando el programa de potencial descrito en la Tabla 3 para la polarografía de pulso normal y el descrito en la Tabla 5 para la voltamperometría cíclica. No se compensó la caída óhmica de la solución.

5.9 Validación de los métodos de polarografía de pulso normal y cronoamperometría

Como primer paso para la validación, se realizó la verificación de la calibración del instrumento; posteriormente se verificaron los parámetros de desempeño de los métodos.

5.9.1 Calificación del equipo

Se realizó mediante la simulación de una determinación por voltamperometría cíclica con la celda de prueba del equipo, con lo cual se verificó que el equipo estuviera trabajando correctamente en sus componentes electrónicos. Este procedimiento se realizó una vez por semana durante tres semanas no consecutivas.

A su vez, la verificación de la calibración del equipo se realizó mediante la determinación de un estándar de alta pureza de Pb (II) de concentración 1×10^{-3} M preparado en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5. La cuantificación se realizó por la técnica de adiciones estándar. Este procedimiento se realizó por siete días alternos durante el periodo de validación de los métodos y con los datos obtenidos se realizó una carta control para verificar el desempeño del instrumento.

5.9.2 Parámetros de desempeño de los métodos

Con el propósito de validar la metodología analítica, se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño:

5.9.2.1 Confirmación de la identidad

En una celda de trabajo mantenida en hielo se colocaron 0.16 g de NaOH sólido, 1550 μ L de la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%. La solución se agitó y una vez disuelto el NaOH, se agregaron 1800 μ L del homogenizado de cerebro de rata, el pH final de la solución fue 6.7. La celda se colocó en el electrodo y la solución se desoxigenó con N_2 durante 10 minutos. Posteriormente, se estudió la señal del GSH en el homogenizado

de cerebro mediante polarografía de pulso normal y cronoamperometría. Se hicieron adiciones consecutivas de 14 μL del estándar de GSH 0.025 M preparado en la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10% (ver **Anexo 3**). Se aplicó el programa de potencial descrito en las Tablas 3 y 4.

5.9.2.2 Selectividad/especificidad

En una celda de trabajo mantenida en hielo se colocaron 0.16 g de NaOH sólido, 3270 μL de la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%. Se agitó la solución y una vez disuelto el NaOH se agregaron 80.4 μL de GSH 0.025 M, con esto la concentración final del GSH fue 6×10^{-4} M y el pH final fue 6.7. La celda se colocó en el electrodo y la solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la determinación del GSH bajo las condiciones establecidas para los métodos estudiados (Tablas 3 y 4). A la solución descrita anteriormente se le agregó una alícuota de 28 μL de cisteína 0.025 M y se llevó a cabo su determinación. Se hicieron dos adiciones más de cisteína para dar concentraciones de 4 y 6×10^{-4} M, mientras la concentración de GSH se mantuvo prácticamente constante (6×10^{-4} M). Se estudiaron las señales obtenidas, y se repitió el procedimiento para la N-acetilcisteína.

5.9.2.3 Límite de detección y límite de cuantificación

En una celda de trabajo mantenida en hielo se preparó el blanco de muestra, colocando 0.16 g de NaOH sólido y 3350 μL de la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%. La solución se agitó y una vez disuelto el NaOH, la celda se colocó en el electrodo, el pH final de la solución fue 6.7. Esta se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos y se llevó a cabo su determinación de acuerdo a las condiciones establecidas en las Tablas 3 y 4 para los métodos en estudio. Este proceso se repitió 10 veces, con lo cual se obtuvo el promedio y la desviación estándar de las lecturas de corriente.

5.9.2.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal

Se prepararon distintos blancos de muestra fortificados con GSH desde 1×10^{-5} M hasta 4×10^{-3} M. Se llevó a cabo su determinación en la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10% neutralizados con NaOH (el pH final de la solución fue 6.7), aplicando el programa de perturbación de los métodos polarográficos descrito en las Tablas 3 y 4. Se construyeron cinco curvas de calibración y se determinó visualmente el intervalo lineal y de trabajo de ambos métodos.

5.9.2.5 Exactitud

Se realizó mediante la comparación con una técnica espectrofotométrica, en la cual el tratamiento de la muestra biológica fue similar al de los métodos polarográficos, con excepción de que se empleó HPO_3 al 5% para llevar a cabo la precipitación de las proteínas. La determinación espectrofotométrica está basada en el método de Ellman [36], realizando las lecturas a una longitud de onda de 412 nm e interpolando los valores de absorbancia sobre una curva de calibración de GSH (ver **Anexo 4**).

5.9.2.6 Incertidumbre de medición

Se determinó calculándose el intervalo de confianza de la exactitud de los métodos estudiados, considerando un nivel de confianza del 95%.

5.9.2.7 Sensibilidad

Se determinó mediante la construcción de cinco curvas de calibración de GSH en el intervalo de trabajo establecido. Las curvas se realizaron en la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10% neutralizadas con NaOH para alcanzar un pH final de 6.7. Se aplicó el programa de perturbación de los métodos polarográficos descrito en las Tablas 3 y 4.

5.9.2.8 Recuperación

Se determinó con cinco homogenizados de cerebro distintos. El cerebro se dividió en lóbulo izquierdo y lóbulo derecho. El lóbulo izquierdo se pesó, se midió su volumen y se colocó en el homogenizador, junto con 100 μL del estándar de GSH 0.025 M. Posteriormente, se siguió la metodología descrita en la secciones 5.2 y 5.2.2. Su determinación constituyó la lectura en la muestra fortificada.

Con el lóbulo derecho se siguió nuevamente la metodología descrita en la secciones 5.2 y 5.2.2. Su determinación constituyó la lectura en la muestra sin fortificar. La concentración de fortificación del estándar de GSH se calculó teniendo en cuenta el volumen del cerebro.

VI. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

VI. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

6.1 Dominio de electroactividad

Como primer punto, en las Figuras 15 y 16 se muestra el dominio de electroactividad de la solución de trabajo (blanco) obtenido con las técnicas de voltamperometría cíclica y polarografía de pulso normal, respectivamente. La solución de trabajo consistió en la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco 9.5 mM pH 7.4 y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. En la Figura 15, para el voltamperograma cíclico correspondiente al blanco de reactivos se aprecia una señal alrededor de -0.4 V, que no se sabe con seguridad a qué especie es atribuible ya que el blanco consta de muchas sales inorgánicas, o bien podría deberse a alguna impureza de los reactivos. Se adicionó una alícuota de estándar de GSH y se observó que su señal aparece bien resuelta, es decir, que la señal observada en el blanco no interfiere con la del GSH. Al analizar los polarogramas de la Figura 16 obtenidos con la técnica de pulso normal, se observa que no existe interferencia en la zona de electroactividad para la señal del GSH. Con lo anterior, la mezcla de amortiguador Dulbecco, HPO_3 y NaOH resultó ser una buena opción para la determinación del GSH. Cabe mencionar que las barreras del dominio de electroactividad están dadas por la reducción del protón y por la oxidación del electrodo de mercurio.

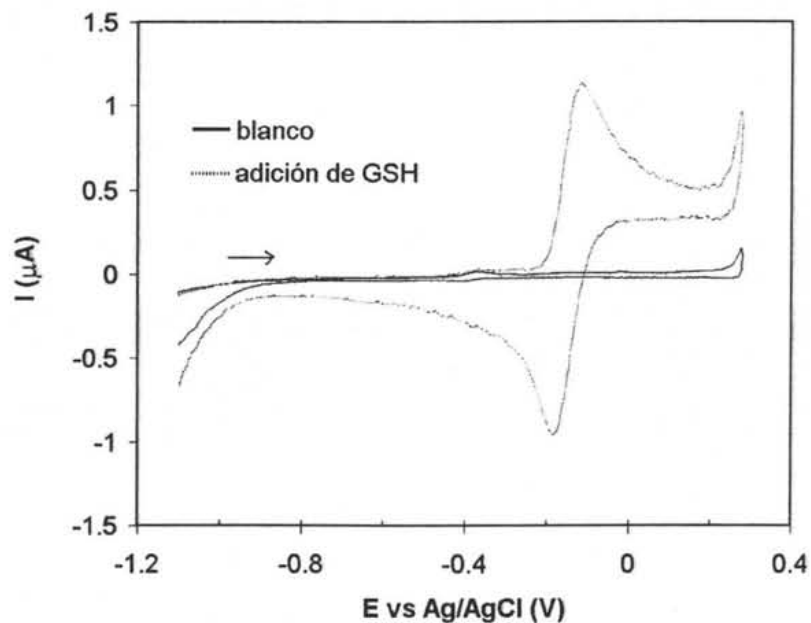


Figura 15. Dominio de electroactividad de la solución de trabajo. pH final 6.7; EMGP (gota mediana). PI=-1.1 V; V1=0.28 V; IB=2 mV; DP=0.04 s; VB=50 mV/s. Adición de GSH 8×10^{-4} M

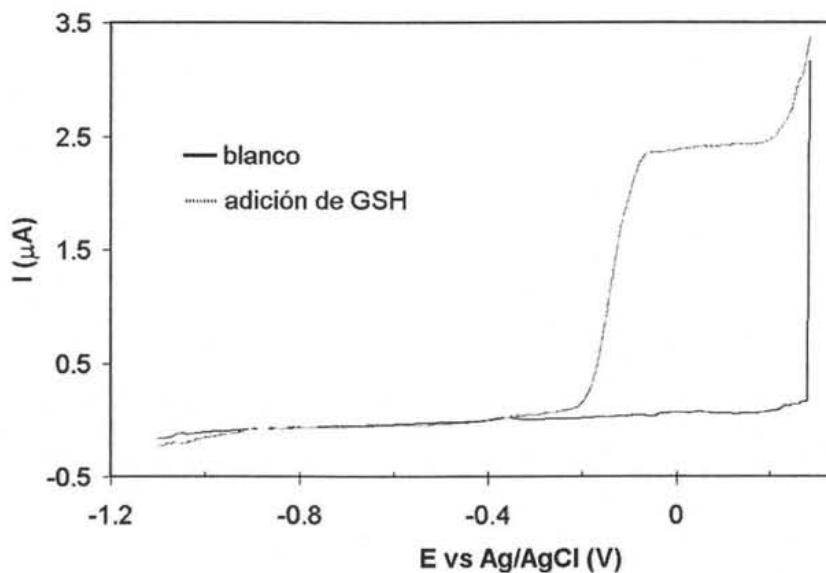


Figura 16. Dominio de electroactividad de la solución de trabajo. pH final 6.7. Adición de GSH 8×10^{-4} M. EGM; PI=-1.1 V; PF= 0.28 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

6.2 Variación de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica

Con la finalidad de caracterizar el comportamiento difusional del sistema del glutatión a la concentración de 8×10^{-4} M se realizó el experimento de variación de la velocidad de barrido de potencial en el sistema del GSH mediante voltamperometría cíclica y se observó que los potenciales de pico (E_p) se desplazan alrededor de 10 mV hacia potenciales más positivos, lo que hizo suponer que se debía al efecto de la caída óhmica del sistema, por lo que se procedió a evaluarla. El valor de la resistencia no compensada de la solución fue de 212Ω , el cual al ser multiplicado por la intensidad de corriente registrada en el equipo (aproximadamente $2 \mu\text{A}$), genera una caída de potencial alrededor de 0.4 mV. Como este valor no es comparable con los incrementos de barrido de potencial empleados en los experimentos, el cual es de 4 mV, se observó que a velocidades de barrido bajas no hay efecto alguno si se compensa o no la caída óhmica en los experimentos (Figura 17).

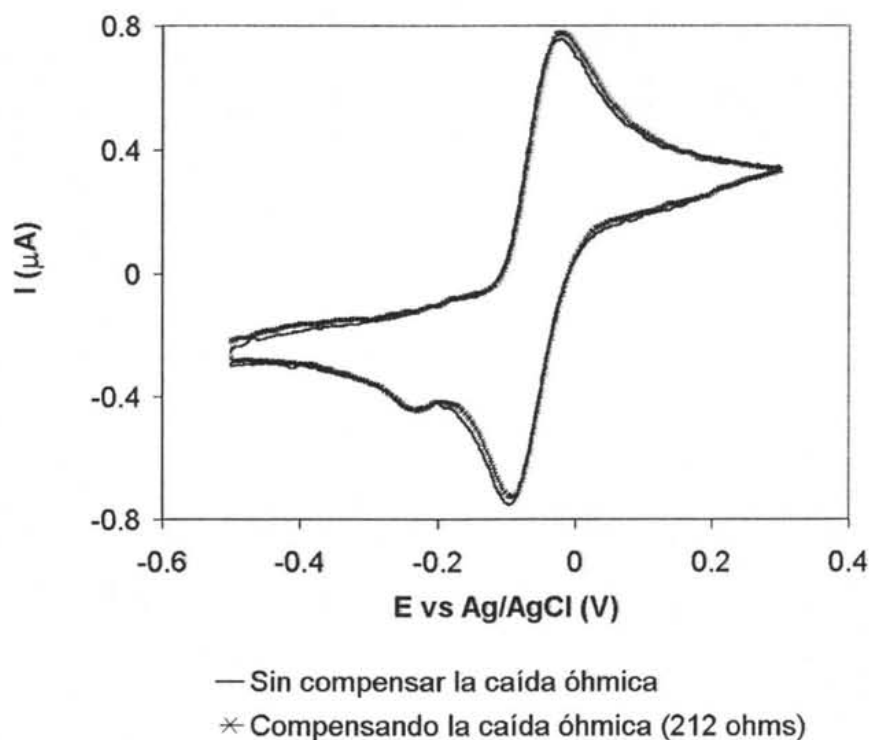


Figura 17. Efecto de la compensación de caída óhmica en el sistema del GSH. $[\text{GSH}] = 8.3 \times 10^{-4}$ M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5; EMGP (gota chica). $\text{PI} = -0.5$ V; $\text{V1} = 0.3$ V; $\text{IB} = 2$ mV; $\text{DP} = 0.04$ s; $\text{VB} = 50$ mV/s.

Entonces, se corrieron los voltamperogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido compensando la caída óhmica de la solución (Figura 18), y se verificó que aún compensando la caída óhmica ocurría el desplazamiento de potencial de las curvas, lo que se atribuyó a que en la reacción de oxidación del GSH sobre un electrodo de mercurio está involucrada una reacción química. De esta manera, un mecanismo electroquímico-químico concuerda con el desplazamiento del potencial observado [10].

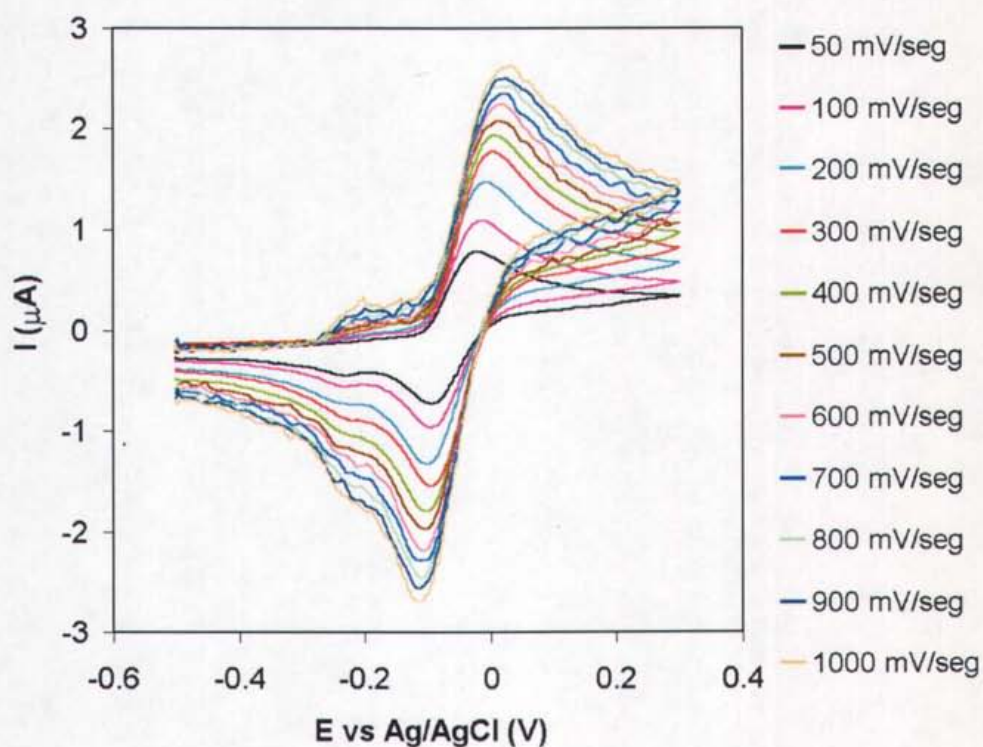


Figura 18. Efecto de la velocidad de barrido en el sistema del GSH. $[\text{GSH}] = 8.3 \times 10^{-4} \text{ M}$; Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5. EMGP (gota chica). $\text{PI} = -0.5 \text{ V}$; $\text{V1} = 0.3 \text{ V}$; $\text{IB} = 2 \text{ mV}$; $\text{DP} = 0.04 \text{ s}$; $\text{RNC} = 212 \Omega$.

6.3 Efecto del pH sobre el sistema GSH/GSSG

De acuerdo a los resultados del experimento de variación de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica y a lo que se ha reportado en la literatura [38], el comportamiento del sistema rédox del GSH está relacionado con la acidez de la solución, por lo cual en esta sección se estudió el efecto del pH sobre las señales del GSH mediante las técnicas de voltamperometría cíclica y polarografía de pulso normal.

6.3.1 Comportamiento de las señales del GSH en función del pH en voltamperometría cíclica

En la Figura 19 se muestran los voltamperogramas del GSH obtenidos a distintos valores de pH, en éstos se observa que el potencial de pico de las curvas se desplaza hacia valores más catódicos conforme aumenta el pH de la solución. Cuando se analiza la relación de intensidades para los picos anódico y catódico, ésta es cercana a 1 (Tabla 6) lo que indica que el sistema en estudio es reversible. Además, este sistema tiende a un comportamiento de transferencia monoelectrónica rápida ya que, al promediar los datos de la segunda columna para los valores de pH 4 a 8 resulta un promedio de 51.1 mV para la relación $E_{pa}-E_{pc}/2$, cercano al valor de 56.5 mV establecido para un sistema rápido [8]. Cabe señalar que para el intervalo de pH 6 a 7 el valor de la relación $E_{pa}-E_{pc}/2$ se mantiene casi constante, mientras que para valores de pH mayores a 9 el sistema deja de comportarse de forma rápida. Lo último se confirma al observar que el valor de la diferencia $E_{pa}-E_{pc}/2$ para pH 10 (88 mV) es notablemente mayor que el valor de referencia de 56.5 mV. Cabe mencionar que no se analizaron valores de pH menores a 4 ya que están alejados del valor de pH fisiológico.

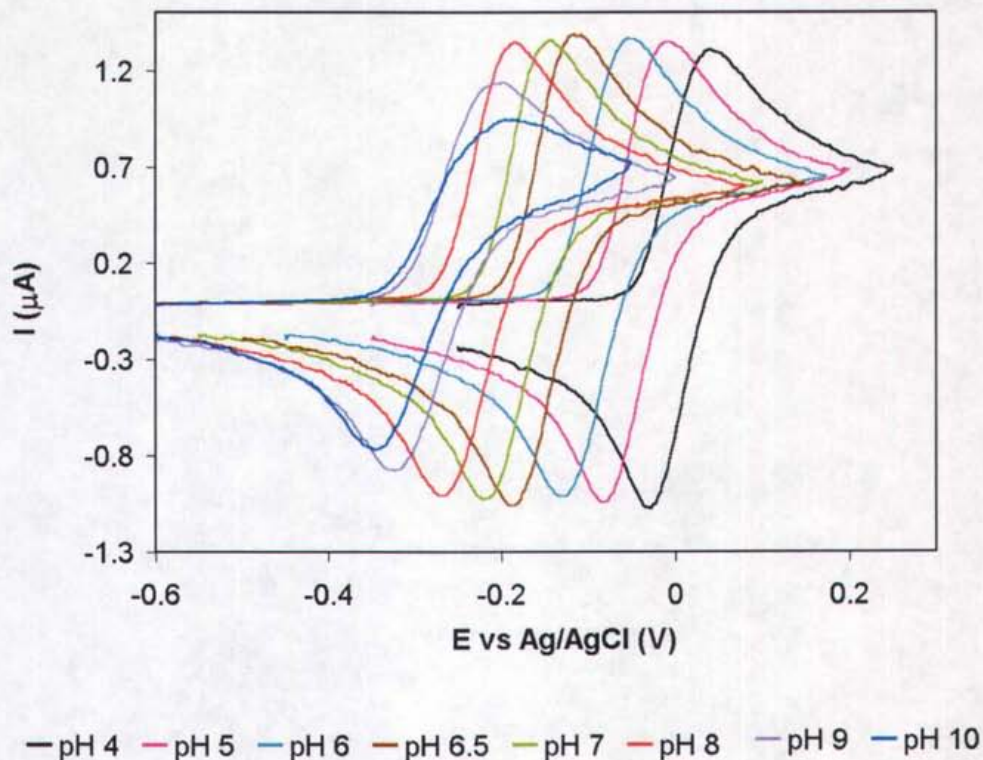


Figura 19. Señales del GSH en voltamperometría cíclica obtenidas a diferentes valores de pH de la solución. $[GSH] = 8.3 \times 10^{-4}$ M. La concentración de los amortiguadores de pH es 0.1 M. EMGP (gota mediana). $IB = 2$ mV; $DP = 0.04$ s; $VB = 50$ mV/s.

Tabla 6. Efecto del pH sobre los parámetros de rapidez del sistema redox del GSH en voltamperometría cíclica

pH	I_a/I_c	$E_{pa} - E_{pa}/2$ (mV)
4	0.92	48.6
5	0.96	48.0
6	0.96	47.9
6.5	0.94	46.3
7	0.96	48.5
8	1.0	52.7
9	0.96	66.0
10	1.0	88.0

En sistemas rápidos, $E_p - E_p/2 = 56.5/n$

6.3.2 Comportamiento de las señales del GSH en función del pH en polarografía de pulso normal

Como se observa en la Figura 20, el potencial de media onda ($E_{1/2}$) de las curvas obtenidas en polarografía de pulso normal se desplaza hacia potenciales más catódicos conforme el pH de la solución aumenta (al igual que en voltamperometría cíclica). Cuando se hace el análisis Ilkovic-Levich para las señales (Tabla 7), se obtienen líneas rectas cuya pendiente promedio es de 54 mV, valor que se aproxima al de 59.1 mV establecido para un sistema monoelectrónico rápido y reversible [8]. Cabe mencionar que para las señales de pH 9 y 10 no se determinó el potencial de media onda ($E_{1/2}$), dado que las curvas no alcanzan una meseta de corriente de difusión (I_d) bien definida. Por lo tanto, tampoco se realizó su análisis logarítmico.

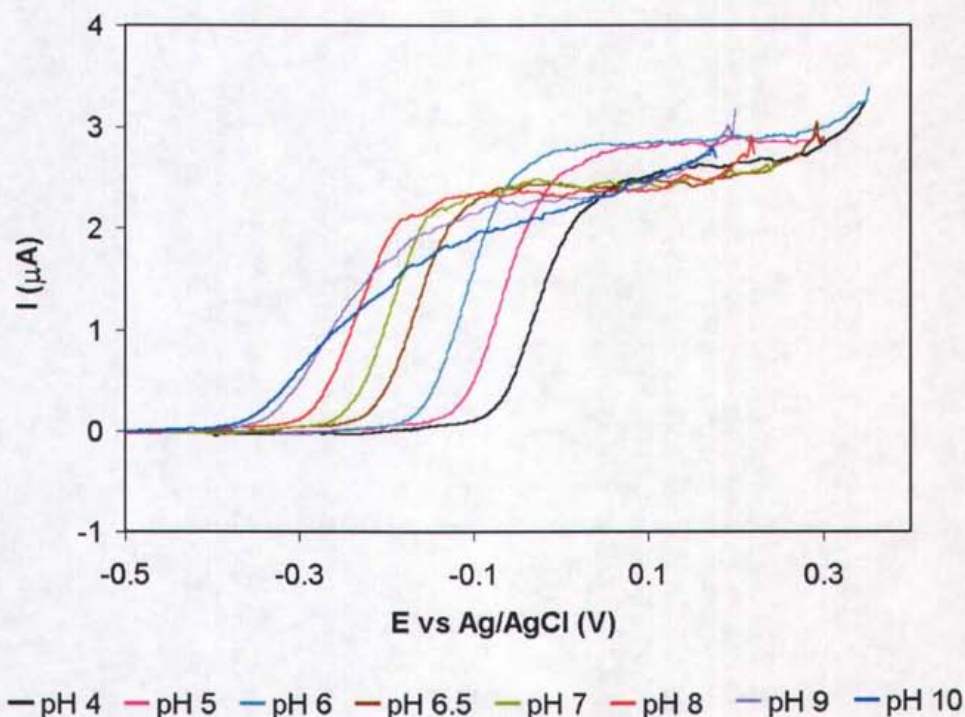


Figura 20. Señales del GSH en polarografía de pulso normal obtenidas a diferentes valores de pH de la solución. $[GSH]=8.3 \times 10^{-4}$ M. La concentración de los amortiguadores de pH es 0.1 M. EGM. $I_B=4$ mV; $TG=0.8$ s; $DP=0.2$ s.

Tabla 7. Análisis logarítmico de las señales en p. pulso normal

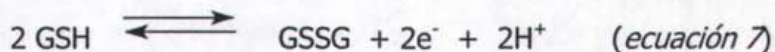
$$E = E_{1/2} + RT/nF \log[(I_d - I)/I]$$

pH	$E_{1/2}$ (mV)	Pendiente (mV)
4	-18	59
5	-60	58
6	-105	52
6.5	-164	51
7	-193	51
8	-229	55

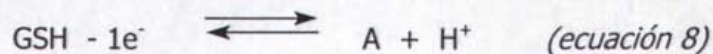
Para un sistema rápido, la pendiente = $59.1/n$

6.3.3 Estequiometría de la reacción electroquímica

En la Figura 21, a partir de la gráfica de $E_{1/2}$ vs pH obtenida con los datos de la sección 6.3.2, se determinó que la relación estequiométrica del protón con el número de electrones transferido en la reacción es de 1, ya que la pendiente de esta curva es de 56 mV, cercano al valor de 59.1 mV; este hecho es consecuente con la dependencia esperada por la ecuación 7.



Para corroborar dicha ecuación electroquímica se procedió a determinar el número de equivalentes de carga mediante el análisis de las curvas I-E [8]. Este análisis consistió en evaluar la función $E = E_{1/2} + RT/nF \log[(I_d - I)/I]$ para la zona de control mixto de las curvas indicadas. La pendiente de este tipo de análisis indica el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica (51.9 mV/n). Para estos experimentos se obtuvo un valor de $n=1$ (sección 6.3.2), que no corresponde a lo indicado por la ecuación 7. Así, la reacción electroquímica completa sería:



Donde A corresponde a la especie GSHg, como ya lo ha reportado Kolthoff [38]. De acuerdo a lo anterior, se confirmó que la reacción electroquímica completa se expresa como:

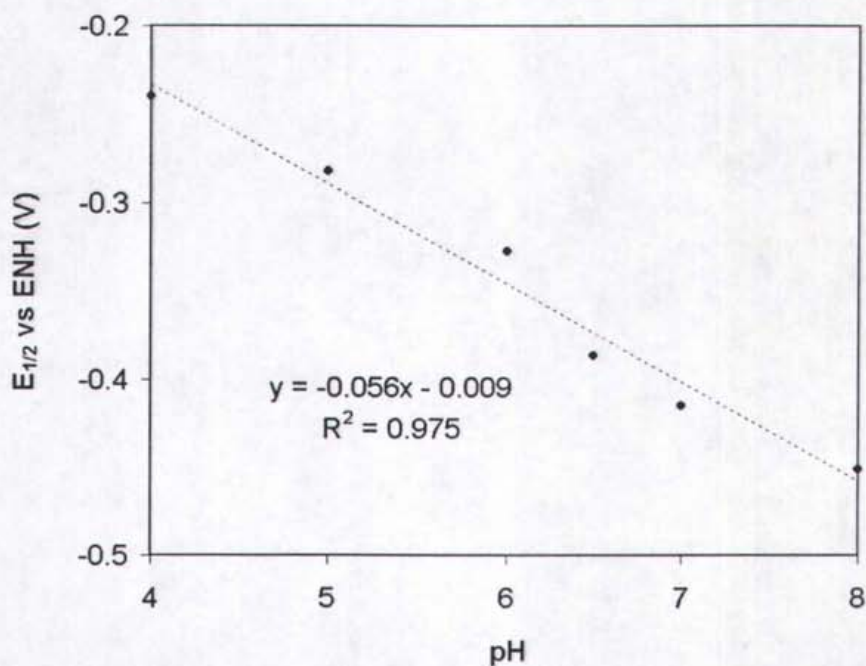


Figura 21. Gráfica de $E_{1/2}$ vs pH para el glutatión, obtenido con la técnica de polarografía de pulso normal. $[\text{GSH}] = 8.3 \times 10^{-4}$ M, en los amortiguadores de pH correspondientes, cuya concentración es 0.1 M.

6.4 Optimización de los parámetros de la polarografía de pulso normal

Para los resultados que se presentan en esta sección se empleó como sistema una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en amortiguador de fosfatos pH 6.5. Con esta solución estándar se determinó el efecto que tuvo la variación de los parámetros polarográficos de la técnica de pulso normal tales como el incremento del barrido, el tiempo de goteo y la duración del pulso sobre la forma y tamaño de la señal polarográfica del GSH.

6.4.1 Incremento del barrido (IB)

Para este parámetro, el valor máximo permitido por el equipo y el programa que lo controla son 20 mV. En los polarogramas de la Figura 22 se observa que para el intervalo de incremento del barrido de 2 a 14 mV, las curvas presentaron un comportamiento similar. Sin embargo, para un valor de 18 mV la intensidad de la señal disminuye y la señal comienza a presentar distorsiones debido a que la velocidad de barrido aumenta.

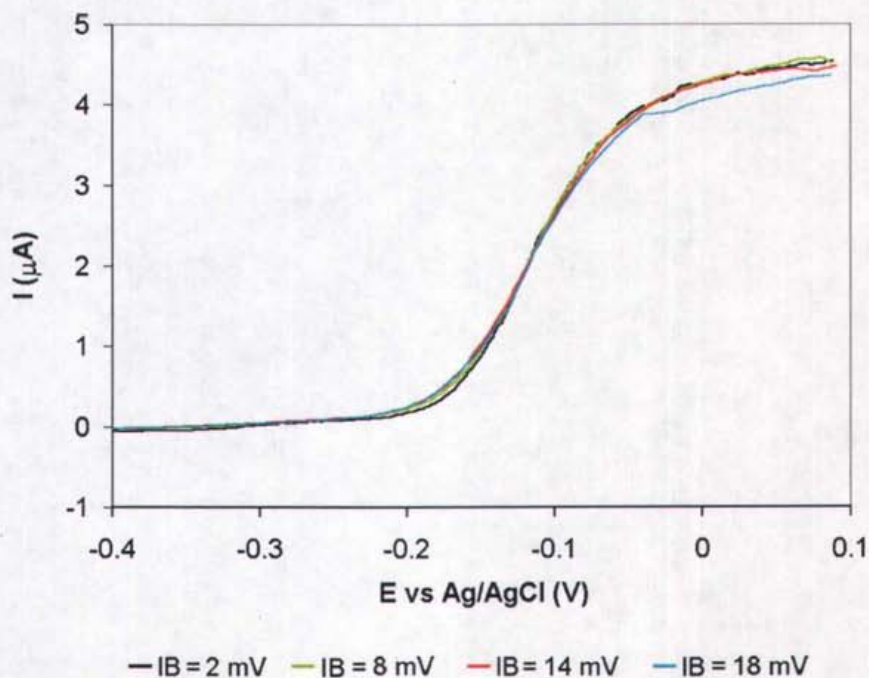


Figura 22. Modificando el incremento del barrido (IB, mV).
 [GSH] = 8.3×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5.
 EGM. PI = -0.4 V; PF = 0.1 V; TG = 1.2 s; DP = 0.05 s.

6.4.2 Tiempo de goteo (TG)

Como se aprecia en los polarogramas de la Figura 22, este parámetro no afecta de forma significativa la forma de la señal pero sí influye en la velocidad de barrido del experimento, pues si el tiempo de goteo es demasiado largo (mayor a 2 s) la velocidad de barrido es lenta, lo que ocasiona que la duración del experimento sea mayor.

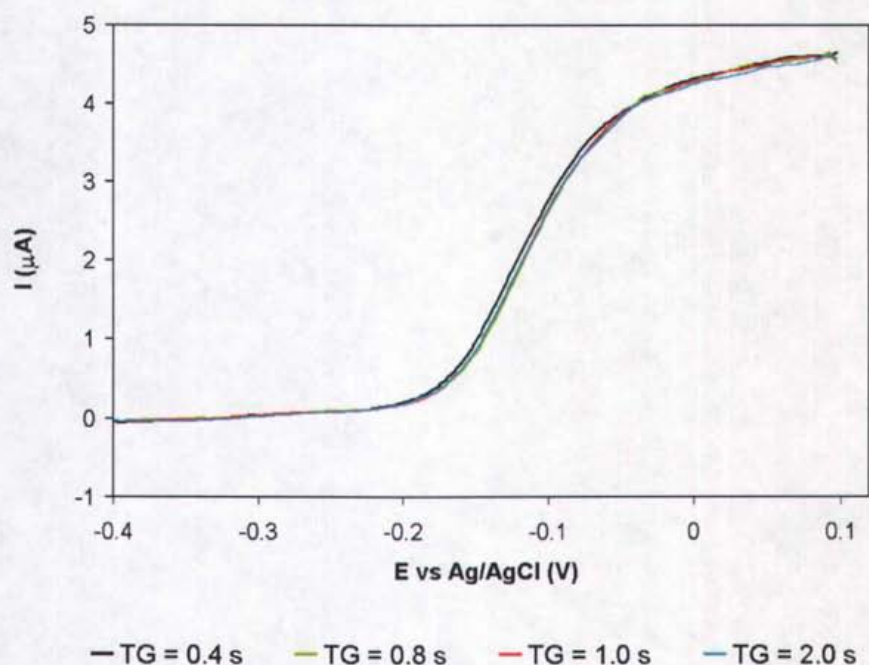


Figura 22. Modificando el tiempo de goteo (TG, s).
[GSH]= 8.3×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M,
pH 6.5. EGM. PI=-0.4V; PF=0.1 V; IB=6 mV; DP=0.05 s.

6.4.3 Duración del pulso (DP)

Como se aprecia en la Figura 23, este es el parámetro que tiene un mayor efecto sobre la forma y tamaño de la señal ya que a valores relativamente pequeños de ancho del pulso (menores a 0.1 segundos) las curvas no alcanzan una meseta definida de corriente límite, debido a que hay una contribución considerable de la corriente capacitiva. Por tanto, la duración del pulso debe ser mayor a 0.1 segundos para minimizar el efecto mencionado anteriormente.

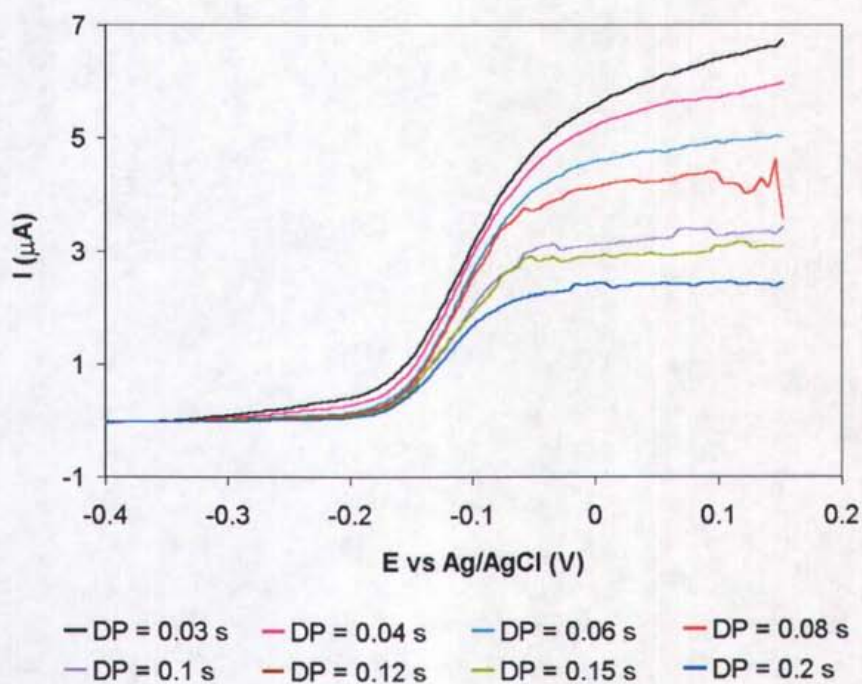


Figura 23. Modificando el ancho de pulso (PW, s).
[GSH]= 8.3×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M,
pH 6.5. EGM. PI=-0.4 V; PF=0.1 V; IB=6 mV; TG=1.2 s.

Con base en los experimentos anteriores, se determinaron los parámetros óptimos para detectar la señal de GSH en cuanto al tiempo de realización del experimento, forma y tamaño de la señal polarográfica, los cuales se muestran en el recuadro, junto con una curva obtenida al emplear dichas condiciones (Figura 24):

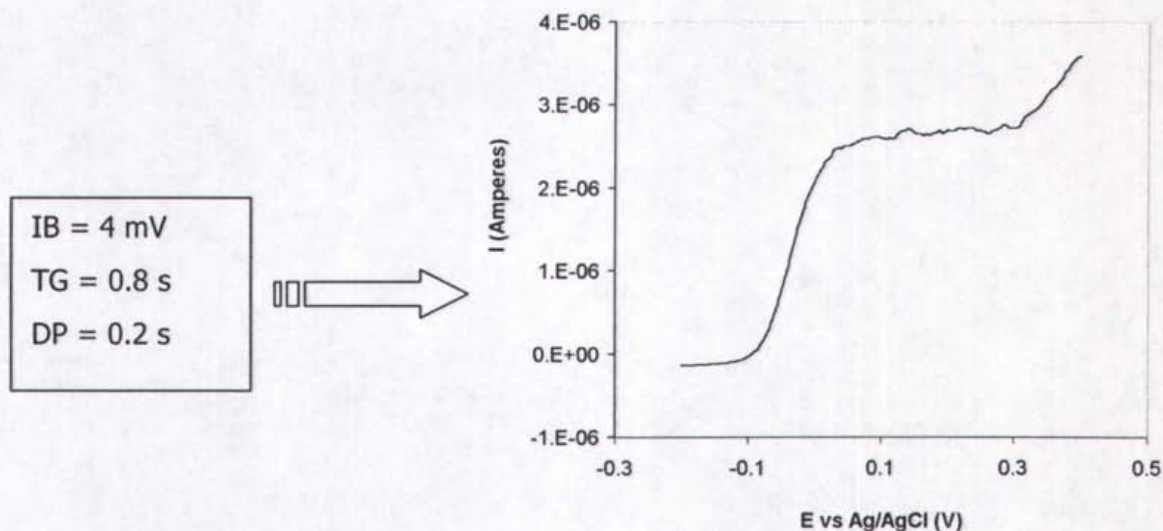


Figura 24. [GSH]= 7×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5; EGM.

6.5 Efecto del tamaño de la gota de mercurio

En cuanto al tamaño de gota, el electrodo de mercurio presenta tres modalidades: chica (área de 0.008 cm^2), mediana (área de 0.014 cm^2) y grande (área de 0.046 cm^2), donde las áreas se determinaron experimentalmente en función del peso de un número determinado de gotas. Para llevar a cabo los experimentos tanto de polarografía de pulso normal como de cronoamperometría, se eligió el tamaño de gota mediana, a menos que se indique en el texto un tamaño de gota distinto. Con dicha área del electrodo, la respuesta en las señales es considerablemente mayor, comparada con la gota chica (Figuras 25 y 26). Además de que no origina un gasto excesivo de mercurio, como sucede con la gota grande.

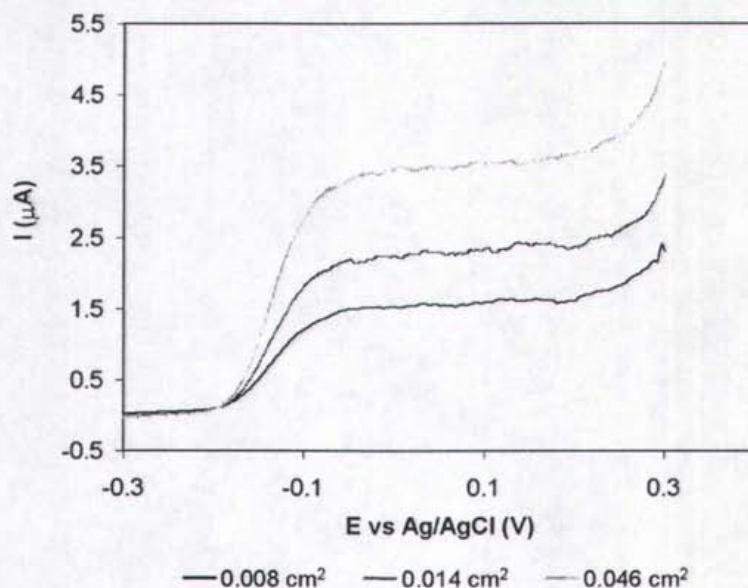


Figura 25. Efecto del área del electrodo de mercurio sobre la señal del GSH en polarografía de pulso normal. Gota chica (0.008 cm^2); gota mediana (0.014 cm^2); gota grande (0.046 cm^2). $[\text{GSH}] = 8 \times 10^{-4} \text{ M}$; amortiguador Dulbecco 9.5 mM , $\text{pH } 7.4$; EGM. $\text{PI} = -0.3 \text{ V}$; $\text{PF} = 0.3 \text{ V}$; $\text{IB} = 6 \text{ mV}$; $\text{TG} = 1.2 \text{ s}$; $\text{DP} = 0.2 \text{ s}$.

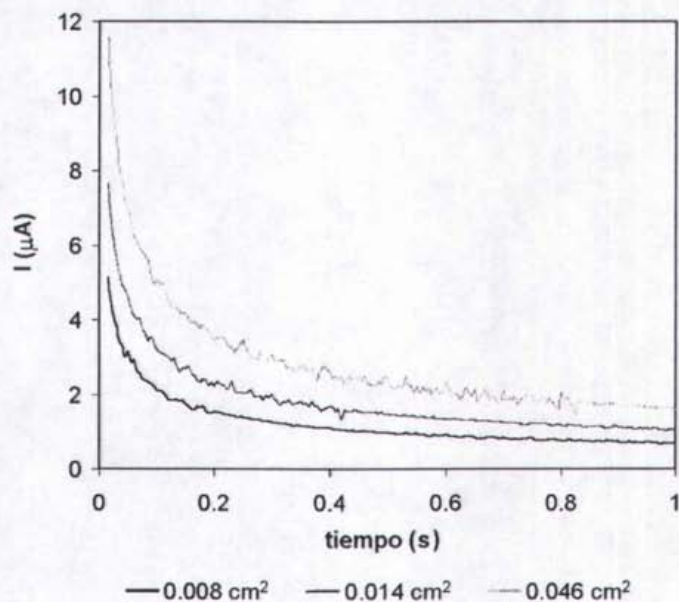


Figura 26. Efecto del área del electrodo de mercurio sobre la señal del GSH en cronoamperometría. Gota chica (0.008 cm^2); gota mediana (0.014 cm^2); gota grande (0.046 cm^2). $[\text{GSH}] = 8 \times 10^{-4} \text{ M}$; amortiguador Dulbecco 9.5 mM , $\text{pH } 7.4$; EMGP. $\text{PI} = -0.3 \text{ V}$; $\text{E1} = 0.1 \text{ V}$; $\text{T1} = 1 \text{ s}$.

6.6 Aplicación de la polarografía de pulso normal y la cronoamperometría para la cuantificación del GSH

Como se observa en las curvas I-E de la Figura 27 con la polarografía de pulso normal se logra una respuesta apreciable de la señal de GSH desde 1×10^{-5} M hasta 1×10^{-3} M. Al igual que la polarografía diferencial de pulsos (ver **Anexo 5**), la de pulso normal se ve afectada por el fenómeno de adsorción del producto de la oxidación del GSH sobre el electrodo de mercurio, cuyo potencial de media onda se encuentra alrededor de -0.2 V. Las concentraciones a las que predomina el efecto adsortivo son de 1×10^{-5} a 2×10^{-4} M, mientras que para las concentraciones de 2 y 2.5×10^{-4} M las curvas muestran la competencia de los fenómenos adsortivo y difusivo, y a partir de 3×10^{-4} M predomina el fenómeno de difusión del analito. Estos datos se corroboran con el desplazamiento en el valor de $E_{1/2}$ de la Figura 28.

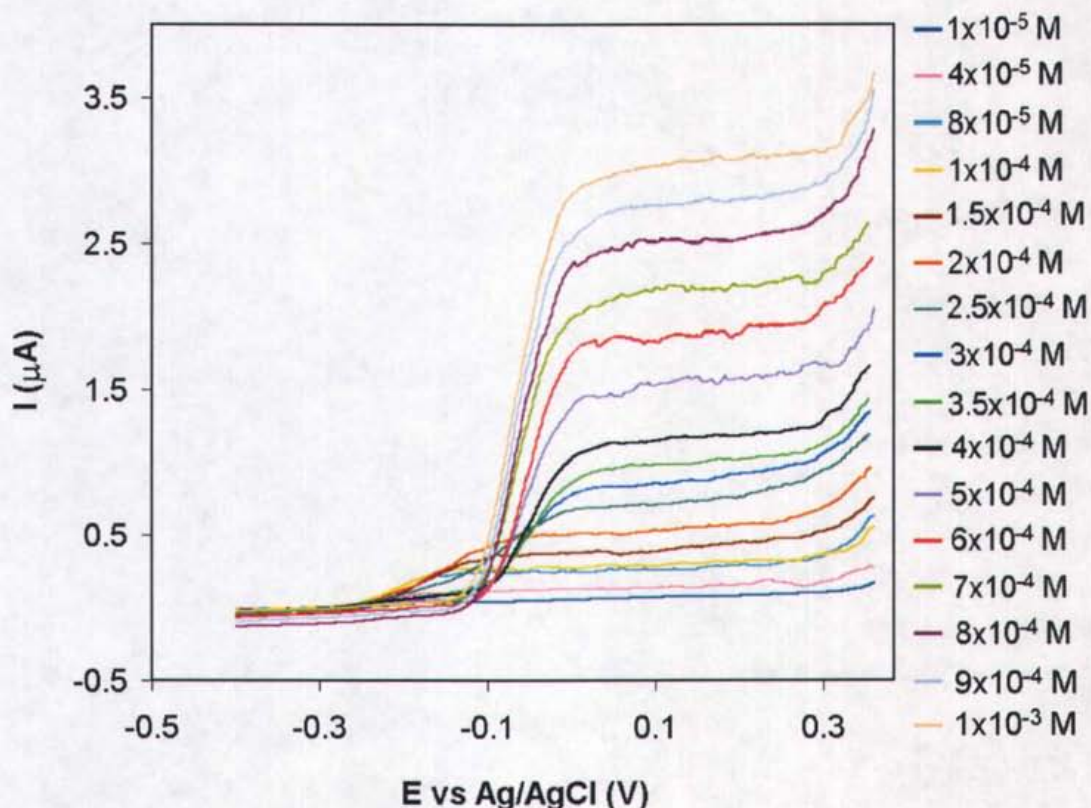


Figura 27. Perfil polarográfico de la curva de calibración del GSH estándar por polarografía de pulso normal. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones 6.3 a 6.7. EGM. PI= -0.4 V; PF= 0.36 V; IB= 4 mV; TG= 0.8 s; DP= 0.2 s.

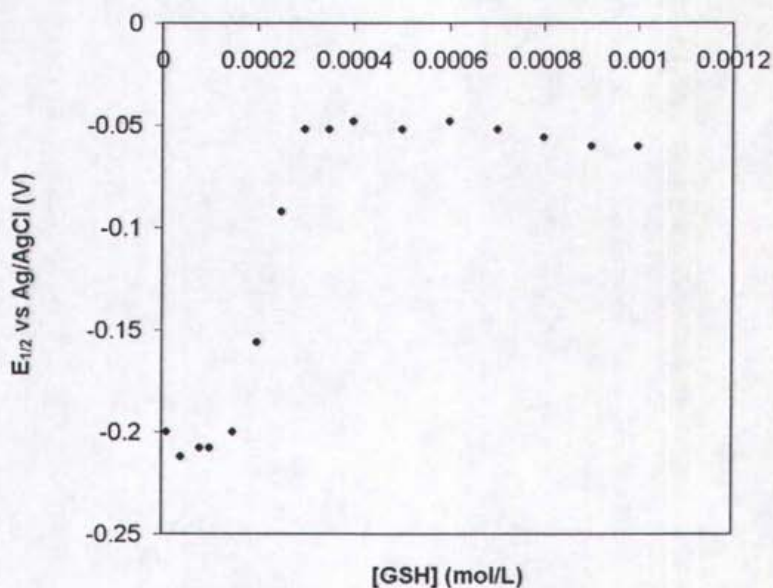


Figura 28. Gráfica de $E_{1/2}$ vs [GSH] para las señales de la curva de calibración del GSH, por polarografía de pulso normal.

Se esperaba que el fenómeno de adsorción fuera mínimo con la técnica de pulso normal debido a que en el programa de perturbación de potencial en función del tiempo el potencial base se mantiene a un valor constante en cada gota nueva de mercurio y el cual se elige precisamente donde no ocurre la reacción electroquímica de interés para cada gota nueva de mercurio, con lo cual la historia previa del potencial no se reflejaría y por esto se esperaba que la adsorción del producto fuera mínima. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 29, la presencia del fenómeno de adsorción no afectó la curva de calibración de GSH, pues ésta presentó linealidad en todo el intervalo de concentraciones mostrado, lo que permitió establecer un intervalo de trabajo y un intervalo lineal de concentraciones de GSH. Por lo tanto, se eligió la técnica de polarografía de pulso normal para la determinación y cuantificación del GSH.

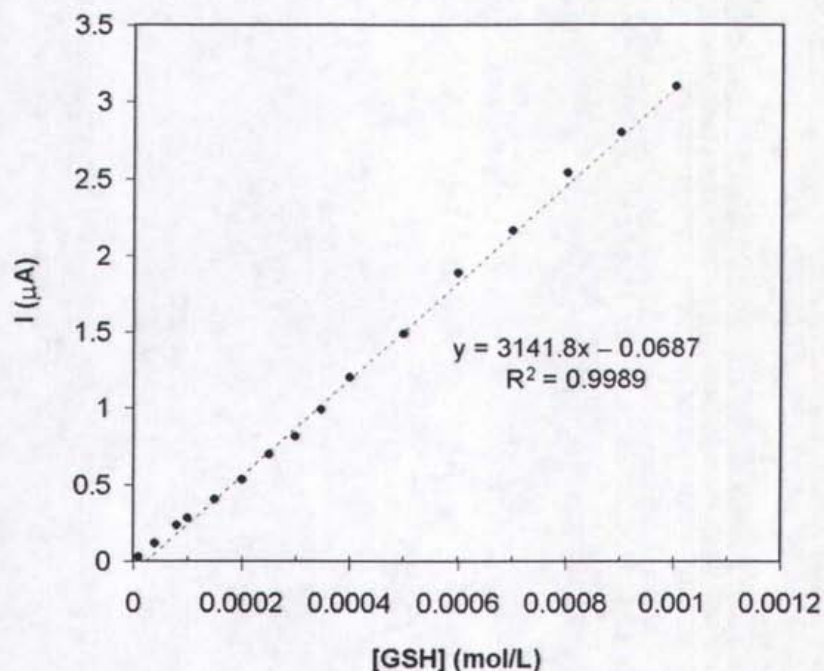


Figura 29. Curva de calibración del GSH por polarografía de pulso normal. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones 6.3 a 6.7. EGM. PI=-0.4 V; PF=0.36 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

Por otro lado, se empleó la cronoamperometría de pulso directo como una técnica alterna, cuya ventaja principal es el menor consumo de mercurio durante los experimentos. Esta técnica emplea la modalidad del electrodo de mercurio de gota pendiente (EMGP); el pulso de potencial de una cronoamperometría equivale a un pulso de potencial de la técnica de pulso normal (Figuras 30 y 31), además de que en la cronoamperometría el pulso de potencial se aplica durante más tiempo. La polarografía de pulso normal equivale a realizar una serie consecutiva de cronoamperometrías al llevar a cabo el barrido de potencial, que parte siempre del mismo potencial inicial.

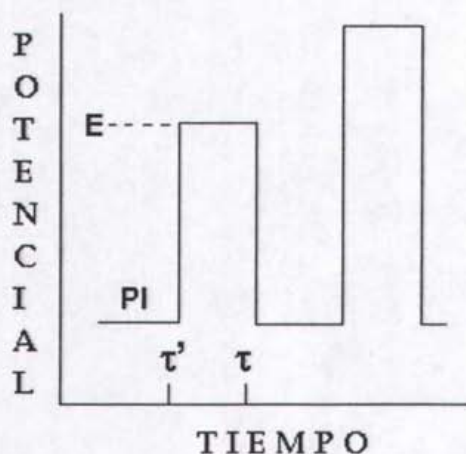


Figura 30. Perturbación de potencial en función del tiempo para polarografía de pulso normal.

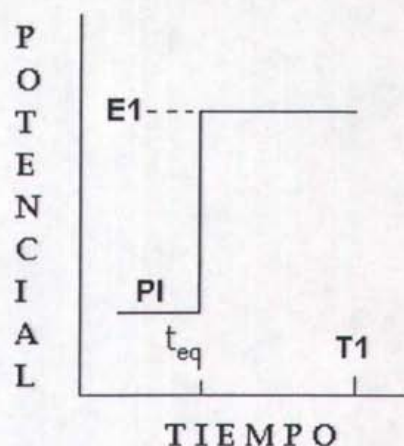


Figura 31. Perturbación de potencial en función del tiempo para cronoamperometría de pulso directo. PI=potencial inicial; E1=potencial del pulso; T1=tiempo del pulso; t_{eq} =tiempo de equilibrio.

En la Figura 32 se puede observar que la cronoamperometría constituye una técnica que ofreció respuesta a las concentraciones de GSH manejadas en este trabajo. Por lo que se procedió a emplearla también como una técnica para la determinación y cuantificación del analito de interés. La Figura 33 muestra la curva de calibración de esta técnica, donde se aprecia su comportamiento lineal en todo el intervalo de concentraciones manejado. La respuesta de la cronoamperometría se comparó con la de la polarografía de pulso normal, para lo cual en todos los experimentos de cronoamperometría realizados la corriente se muestreó a un valor τ de 0.2 segundos, que es el mismo valor para el ancho del pulso en la polarografía de pulso normal.

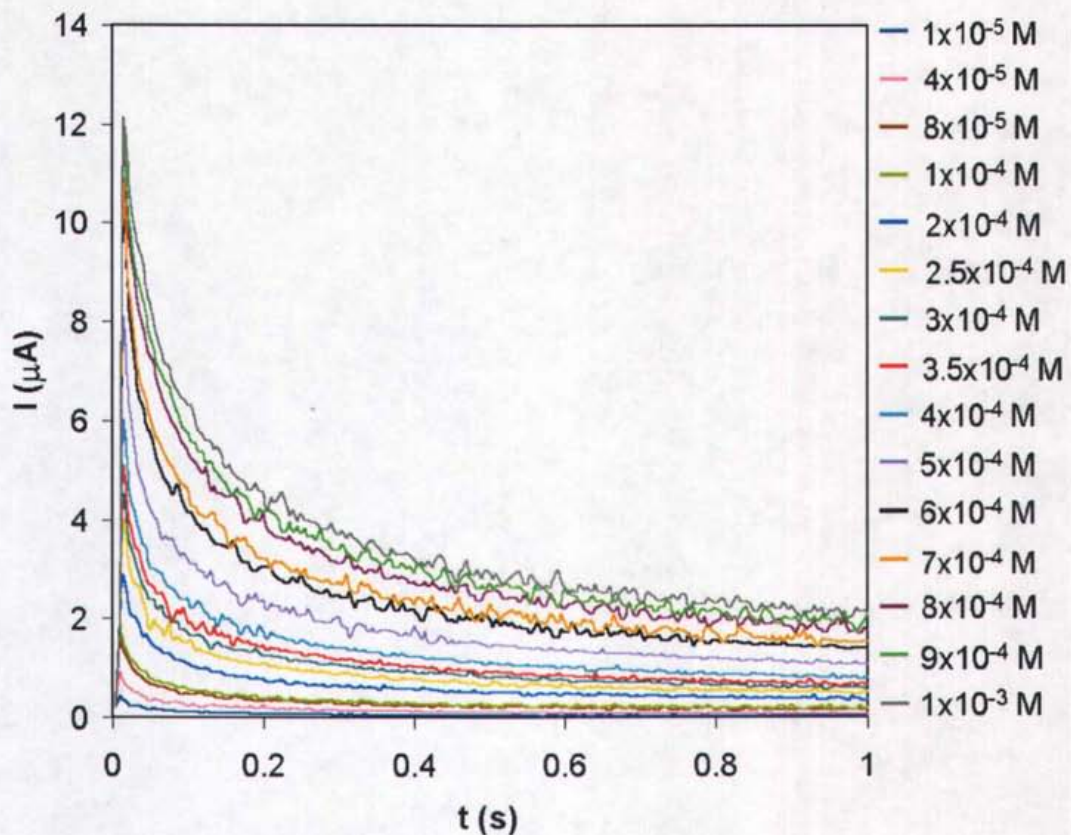


Figura 32. Señales obtenidas en cronoamperometría para distintas concentraciones de GSH. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones 6.3 a 6.7; EMGP; PI=-0.3 V; E1=0.1 V; T1=1 s.

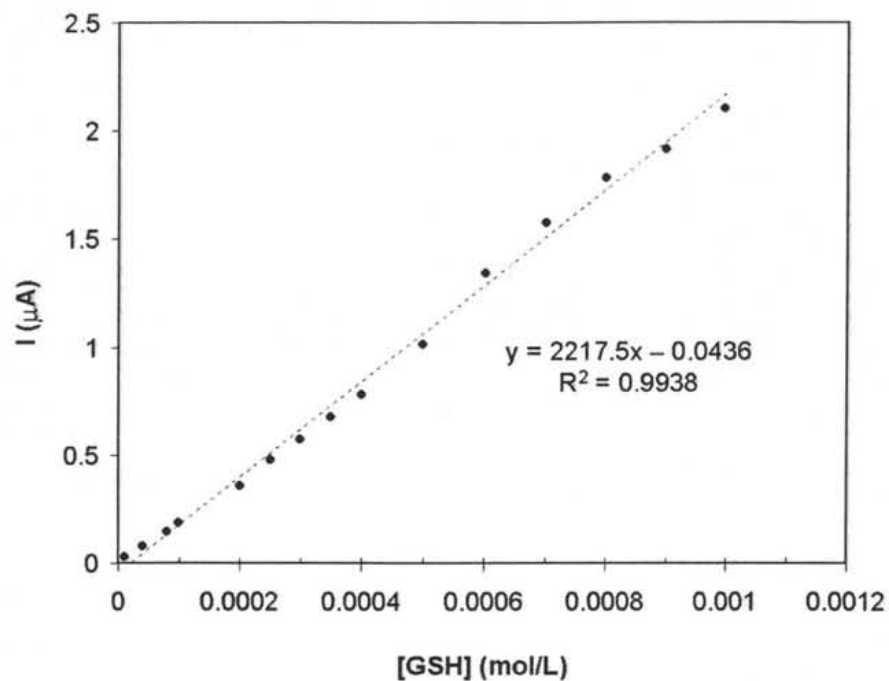


Figura 33. Curva de calibración de GSH obtenidas en cronoamperometría. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones 6.3 a 6.7; EMGP; PI=-0.3 V; E1=0.1 V; T1=1 s.

6.7 Validación de los métodos polarográficos

6.7.1 Calificación del equipo

Las pruebas comprendidas en este apartado constituyen el primer paso en el proceso de validación. Se llevaron a cabo para asegurar que la determinación de los parámetros de desempeño de los métodos fuera hecha utilizando equipos que trabajan satisfactoriamente y que están correctamente calibrados.

6.7.1.1 Respuesta electrónica del equipo

Para verificar la respuesta electrónica del instrumento se simuló una determinación por voltamperometría cíclica empleando la celda de prueba del equipo, en la cual la condición dada por el fabricante para el correcto funcionamiento del equipo consiste en que la gráfica de corriente vs potencial debe ser una línea recta que cruce por el origen, con una pendiente positiva de $10 \mu\text{A}/\text{V}$. Como se aprecia en la Figura 34, al realizar esta determinación se obtuvo una línea recta con pendiente cercana al valor de $10 \mu\text{A}/\text{V}$ y que cruzó por el origen, lo permitió corroborar el buen funcionamiento de la electrónica del equipo.

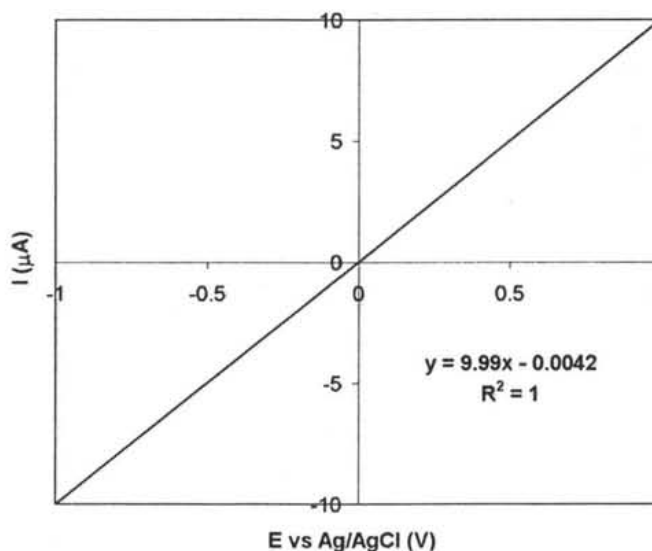


Figura 34. Diagnóstico electrónico del equipo

6.7.1.2 Verificación de la calibración del equipo

Por otro lado, se verificó la calibración del instrumento a través de la determinación de un estándar de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ de concentración 1×10^{-3} M. La cuantificación se llevó a cabo por la técnica de adiciones estándar, empleando la polarografía de pulso normal y la cronoamperometría, en 7 días alternos durante el período de validación del método. La Figura 35 muestra la carta control para la verificación de la calibración del instrumento. En esta gráfica se observa que el equipo se comportó adecuadamente durante el tiempo que duró la validación puesto que las lecturas siempre estuvieron dentro de los límites de precaución ($\pm 2\sigma$) establecidos en la carta control. Asimismo las lecturas por cronoamperometría siguieron el mismo comportamiento.

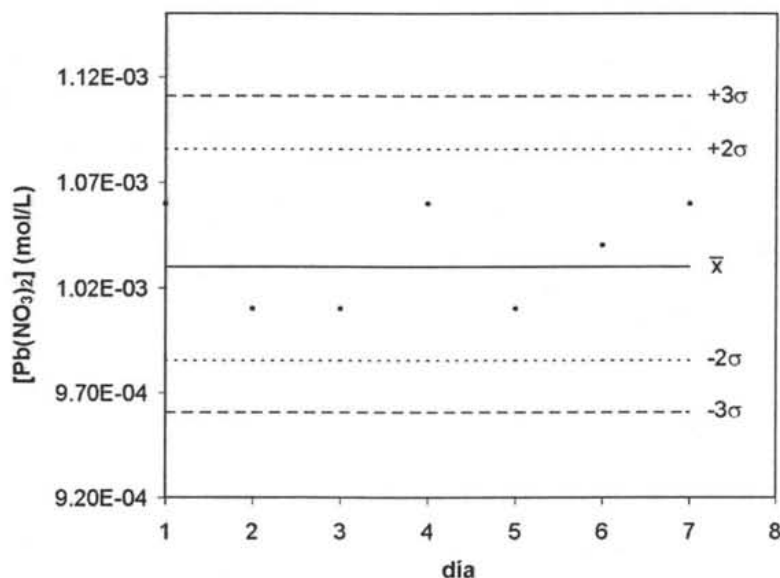


Figura 35. Carta control; verificación de la calibración del equipo bajo las condiciones establecidas en el método de polarografía de pulso normal.

6.7.2 Parámetros de desempeño de los métodos

Con el fin de evaluar los parámetros de desempeño de los métodos de polarografía de pulso normal y cronoamperometría se trabajó con soluciones del homogenizado de cerebro de rata y con la solución estándar de GSH, lo cual brindó los siguientes resultados.

6.7.2.1 Confirmación de la identidad

La Figura 36 muestra el perfil polarográfico de las adiciones estándar de GSH sobre el homogenizado de cerebro. Como se aprecia en la figura, las adiciones de este estándar permitieron confirmar la identidad del analito de interés así como su dependencia con la concentración. A partir de los datos obtenidos por el método de polarografía de pulso normal, se construyó la curva de potencial de media onda *vs* la concentración del estándar de GSH, donde se observó que la curva tiende a un valor constante de potencial (ver recuadro superior), lo que permitió confirmar que en todos los polarogramas la señal corresponden a la especie de interés.

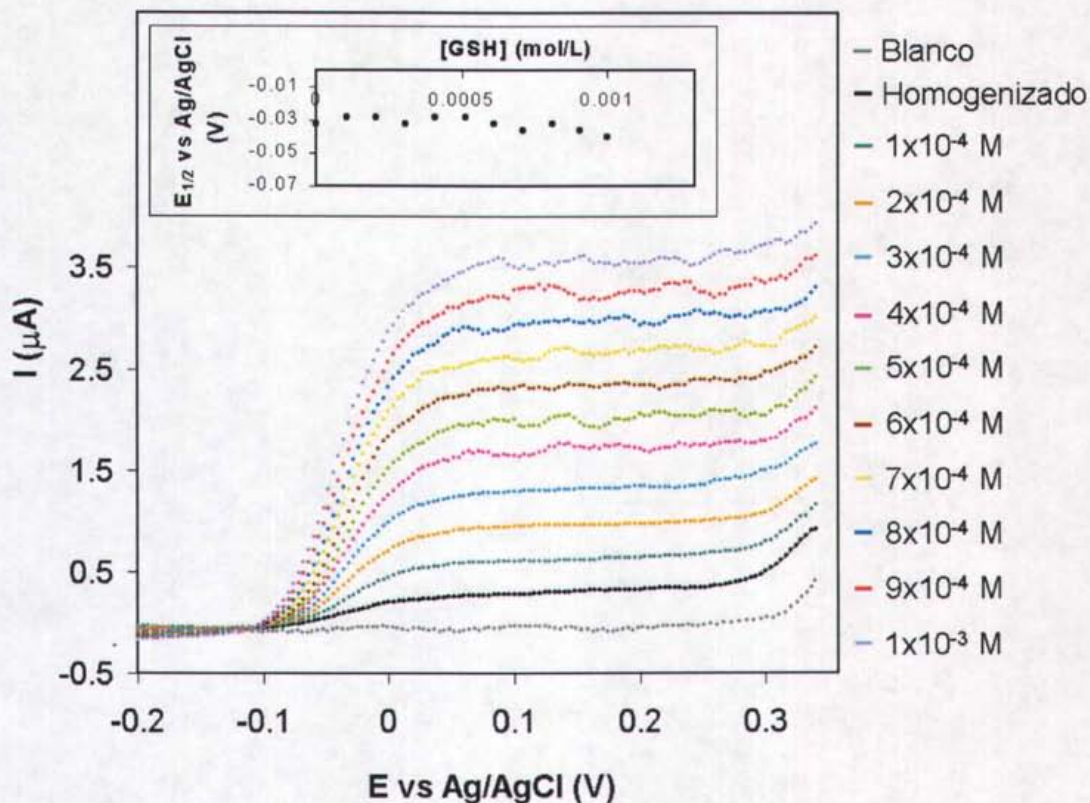


Figura 36. Adiciones estándar de GSH para las concentraciones indicadas sobre el homogenizado de cerebro de rata Wistar, mediante polarografía de pulso normal. En el recuadro: gráfica de $E_{1/2}$ vs $[\text{GSH}]_{\text{estándar}}$. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final 6.7. EGM. PI=-0.2 V; PF=0.35 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

Por otro lado, con la cronoamperometría se obtuvieron las correspondientes curvas de corriente vs tiempo para cada adición del estándar de GSH sobre el homogenizado de cerebro de rata (Figura 37). En todos los experimentos, la corriente se muestreó a un valor τ de 0.2 segundos, que es el mismo valor del ancho de pulso en la polarografía de pulso normal, esto se hizo con el fin de comparar los valores de corriente obtenidos con ambos métodos. En la misma figura se incluyó la curva de corriente vs concentración de

glutación. En esta gráfica, la lectura dada por el homogenizado cae dentro de la línea recta obtenida, lo que permite confirmar la identidad del analito de interés.

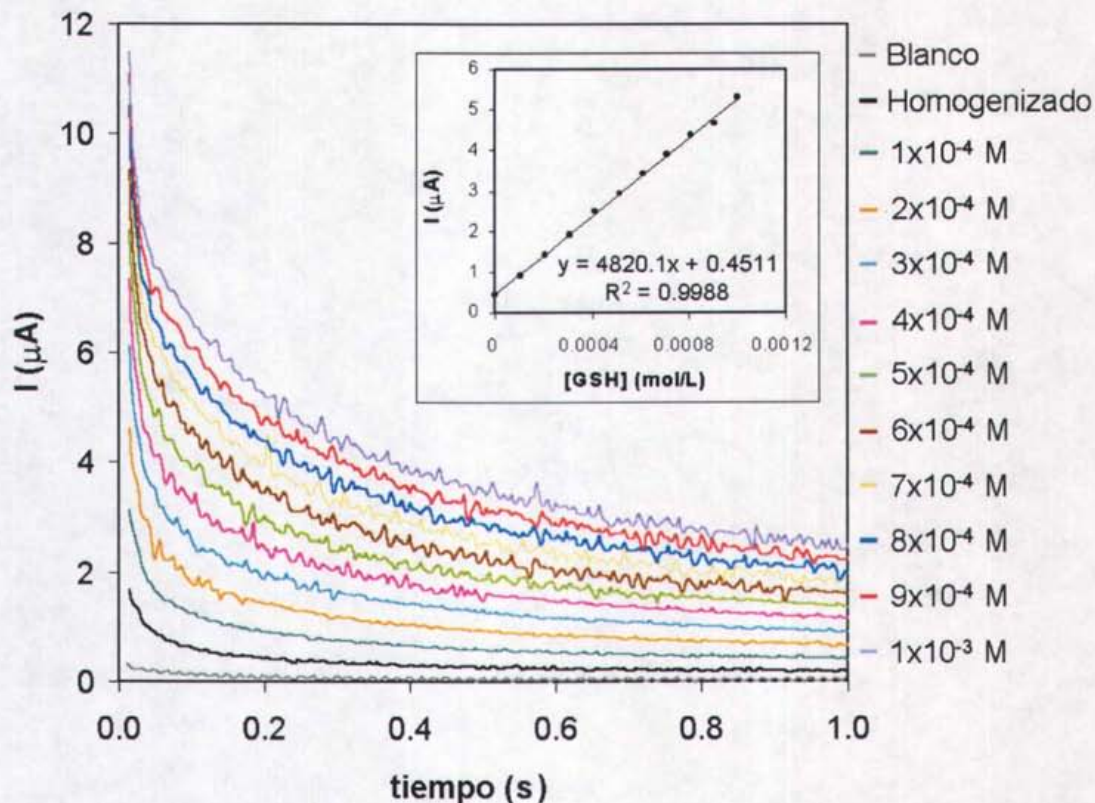


Figura 37. Adiciones estándar de GSH para las concentraciones indicadas sobre el homogenizado de cerebro de rata Wistar, mediante cronoamperometría. En el recuadro: gráfica de I vs $[\text{GSH}]_{\text{estándar}}$. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final 6.7. EMGP. $\text{PI} = -0.3$ V; $\text{E1} = 0.1$ V; $\text{T1} = 1$ s.

6.7.2.2 Selectividad/especificidad

De acuerdo a la literatura, las principales interferencias para la determinación de GSH mediante una técnica electroquímica son aquellas especies que contienen el grupo tiol (SH) en su estructura, entre ellas la cisteína y la N-acetilcisteína [39, 40]. De acuerdo a esto, con el objetivo de evaluar la selectividad de los métodos polarográficos para cuantificar GSH en presencia de las dos interferencias mencionadas se trabajó con soluciones estándar de GSH, cisteína y N-acetilcisteína; se determinó el valor de su $E_{1/2}$ y se comparó con el del GSH. Como se aprecia en la Tabla 8, el $E_{1/2}$ para la cisteína y el GSH difiere en 52 mV, lo que indicaría inicialmente que si estas dos especies se encontraran en solución no sería posible diferenciar sus señales correspondientes.

Tabla 8. Valores experimentales de $E_{1/2}$ para GSH y cisteína

	$E_{1/2}$ vs Ag/AgCl (V)
GSH	-0.112
Cisteína	-0.164

En la Figura 38 se aprecian las señales que permitieron evaluar la selectividad del método para cuantificar el GSH en presencia de cisteína: la curva negra describe la señal de oxidación para el sistema del GSH en una solución 6×10^{-4} M. Las curvas consecutivas corresponden a la adición de una alícuota de cisteína a la solución de GSH para dar una concentración de 2, 4 y 6×10^{-4} M de cisteína. Dado que la cisteína es poco soluble en agua, las señales observadas en esta figura no presentan un incremento notable de corriente para cada adición del compuesto. Asimismo, las concentraciones escritas en la figura no corresponden a la concentración que presentó la solución real. Por otro lado, en la Figura 38 se observa también que al encontrarse tanto el GSH como la cisteína en solución se detecta una sola señal y no dos, como se esperaba en principio, además en la

Tabla 9 se observa que el valor de $E_{1/2}$ para el sistema de GSH+cisteína está más cercano al valor de $E_{1/2}$ del GSH (-0.112V).

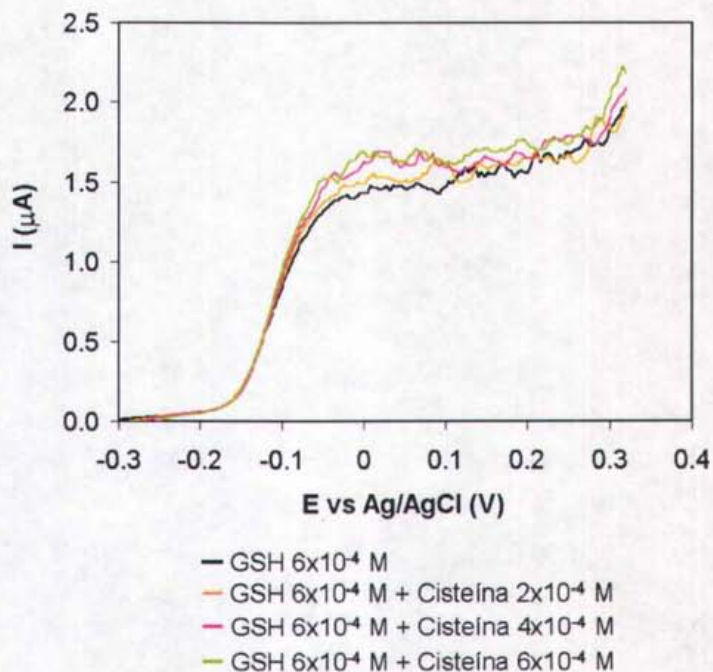


Figura 38. Adiciones de cisteína sobre una disolución de GSH_{estándar}. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final 6.7. EGM. PI=-0.3 V; PF=0.3 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

Tabla 9. Valores de $E_{1/2}$ para las señales de la Figura 40.

[cisteína] añadida (M)	$E_{1/2}$ vs Ag/AgCl (V)
0	-0.112
2×10^{-4}	-0.104
4×10^{-4}	-0.104
6×10^{-4}	-0.104

Con el fin de evaluar la selectividad de los métodos para cuantificar el GSH en presencia de N-acetilcisteína se determinó el valor de su $E_{1/2}$ y se comparó con el del GSH. Como se aprecia en la Tabla 10, el $E_{1/2}$ para la N-acetilcisteína y el GSH difiere en 8 mV, lo que indicaría inicialmente que si estas dos especies se encontraran en solución sería imposible diferenciar sus señales correspondientes. En adición, la Figura 39 muestra las señales que permitieron evaluar la selectividad del método en presencia de N-acetilcisteína: la curva negra describe la señal de oxidación para el sistema del GSH en una solución 6×10^{-4} M. Las curvas consecutivas corresponden a la adición de una alícuota de N-acetilcisteína a la solución de GSH para dar una concentración de 2, 4 y 6×10^{-4} M de N-acetilcisteína. Cabe recalcar que al encontrarse tanto el GSH como la N-acetilcisteína en solución se detecta una sola señal y no dos, como se esperaba en principio, además en la Tabla 11 se observa que el valor de $E_{1/2}$ para el sistema de GSH+N-acetilcisteína se desplaza ligeramente hacia potenciales más catódicos conforme aumenta la concentración de N-acetilcisteína.

Tabla 10. Valores experimentales de $E_{1/2}$ para GSH y N-acetilcisteína

	$E_{1/2}$ vs Ag/AgCl (V)
GSH	-0.112
Cisteína	-0.164

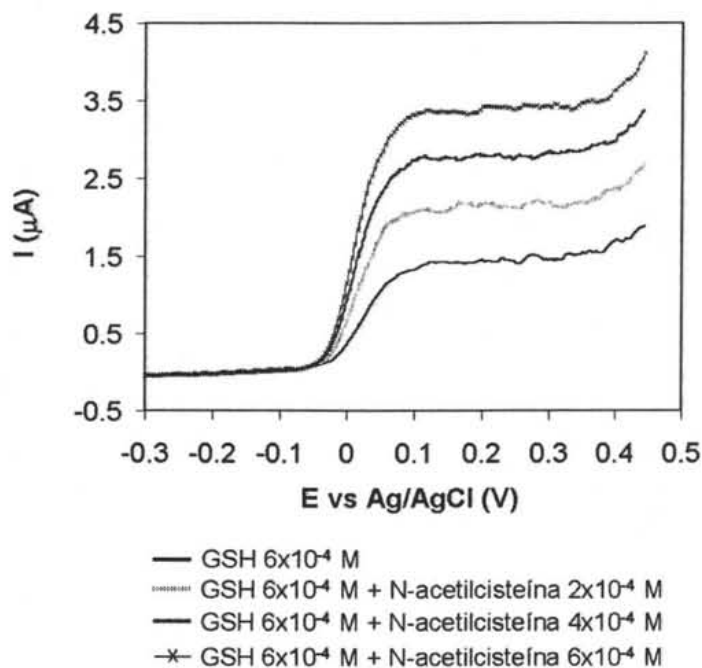


Figura 39. Adiciones de N-acetilcisteína sobre una disolución de GSH_{estándar}. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO₃ al 10%, neutralizada con NaOH. pH final 6.1. EGM. PI=-0.3 V; PF=0.3 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

Tabla 11. Valores de $E_{1/2}$ para las señales de la Figura 39.

[N-acetilcisteína] añadida (M)	$E_{1/2}$ vs Ag/AgCl (V)
0	0.028
2×10^{-4}	0.020
4×10^{-4}	0.016
6×10^{-4}	0.012

Los experimentos anteriores confirmaron que en la presencia de cisteína y N-acetilcisteína tanto la polarografía de pulso normal como la cronoamperometría no son técnicas selectivas para determinar el GSH. Sin embargo, ya que el GSH es el compuesto tiólico de mayor concentración intracelular y que su concentración es de 500 a 1000 veces mayor que cualquier otro par redox intracelular [2,3], puede considerarse que la señal que se monitorea en los homogenizados de cerebro de rata corresponde principalmente a la respuesta dada por el sistema del GSH.

Por otro lado, en la Figura 40 se aprecia la evaluación de la especificidad para la determinación de tioles en la muestra biológica, para lo cual se hizo el barrido de potencial del dominio de electroactividad del homogenizado de cerebro en polarografía de pulso normal. Como se aprecia en esta figura, en el intervalo de potencial de -1.3 a 0.224 V se presenta sólo una señal cuyo $E_{1/2}$ está en -0.132 V. Cuando se hace una adición de GSH 1×10^{-4} M se observa que dicha señal se incrementa y no surge ninguna otra, lo que permitió confirmar que este método es específico para la determinación de tioles totales, como se estableció en la sección anterior, con la salvedad de que la señal que se estudia corresponde principalmente a la respuesta del GSH, dado su mayor concentración intracelular [2,3].

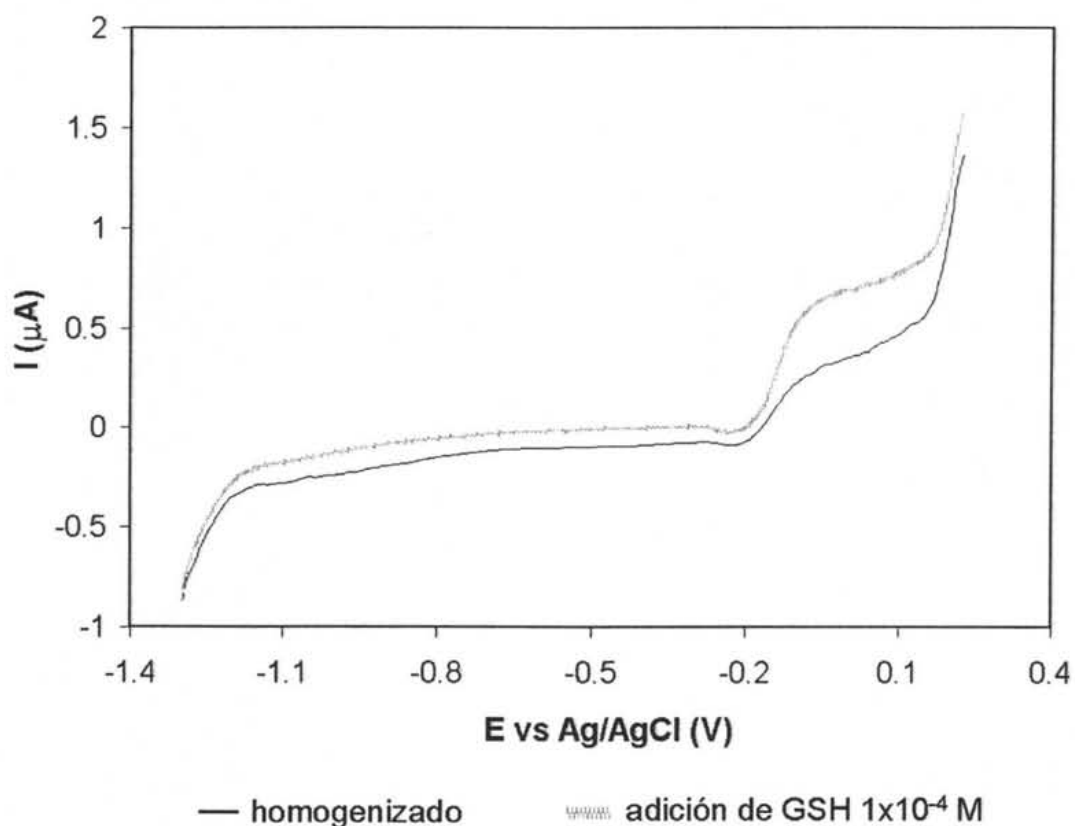


Figura 40. Dominio de electroactividad del homogenizado de cerebro de rata y adición de una alícuota de GSH estándar. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final 6.7. EGM. PI=-1.3 V; PF=0.224 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

6.7.2.3 Límite de detección y límite de cuantificación

Con el propósito de comparar el límite de detección y cuantificación de GSH por los dos métodos polarográficos en estudio, se midió la corriente de 10 blancos de muestra independientes. En la Tabla 12 se muestran los valores del promedio y la desviación estándar de las lecturas.

Tabla 12. Blancos de muestra independientes

Blanco de muestra	I (A)	
	P. Pulso Normal	Cronoamperometría
1	5.8×10^{-9}	9.1×10^{-9}
2	7.1×10^{-9}	1.6×10^{-8}
3	2.8×10^{-9}	2.7×10^{-8}
4	6.1×10^{-9}	2.2×10^{-8}
5	4.1×10^{-9}	3.6×10^{-8}
6	3.9×10^{-9}	3.0×10^{-8}
7	5.6×10^{-9}	2.2×10^{-8}
8	3.7×10^{-9}	3.3×10^{-8}
9	4.7×10^{-8}	2.7×10^{-8}
10	6.5×10^{-9}	2.2×10^{-8}
Promedio	5.0×10^{-9}	2.4×10^{-8}
Desv. Estándar	1.39×10^{-9}	8.0×10^{-9}

Aplicando las siguientes relaciones:

$$L.D = I_{\text{blanco}} + 3\sigma \quad (\text{ecuación 12})$$

$$L.C = I_{\text{blanco}} + 10\sigma \quad (\text{ecuación 13})$$

Y al utilizar estos datos para calcular las concentraciones respectivas mediante la ecuación de la curva de calibración correspondiente, se tienen los valores reportados en la Tabla 13. Estos valores se determinaron considerando linealidad del método hasta esos valores de concentración, como se confirma en la sección 6.7.2.4.

Tabla 13. Límites de detección y de cuantificación de los métodos estudiados

	P. Pulso Normal	Cronoamperometría
Ec. regresión	$2.903 \times 10^{-3}x - 5.722 \times 10^{-8}$	$2.781 \times 10^{-3}x - 9.282 \times 10^{-9}$
L.D (μM)	23	21
L.C (μM)	27	41

Como se aprecia en la tabla anterior, los valores de L.D para ambos métodos son prácticamente iguales, a diferencia del límite de cuantificación, que es relativamente mayor para la cronoamperometría. Por otro lado, la concentración del glutatión basal en los homogenizados es alrededor de 1×10^{-4} M, concentración que es aproximadamente el doble del límite de cuantificación de los métodos. Esto permitió asegurar que su determinación se realizó con precisión y exactitud aceptables.

Se ha reportado que dentro de los métodos más efectivos para realizar la cuantificación del glutatión en matrices complejas se encuentran aquellos que emplean la cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar como métodos de separación, acoplados a sistemas de detección electroquímica. Dichos sistemas emplean electrodos amalgamados de oro/mercurio, con los cuales se han logrado límites de detección desde 21 nM hasta 4 μ M [41-45]. Pero la desventaja de estos métodos es que no emplean técnicas de separación sencillas y los instrumentos no son fáciles de operar. Otras de las técnicas empleadas cuando se trabaja con electrodos de mercurio son la voltamperometría de redisolución catódica y la de redisolución catódica catalítica. Con estas técnicas se han logrado límites de detección para GSH y cisteína desde 0.4 nM hasta 10 nM [46-49].

Cabe mencionar que bajo las condiciones experimentales de este trabajo, se intentó emplear la técnica de redisolución catódica para realizar la determinación del GSH. Sin embargo se observó que la adsorción del analito no era cuantitativa. Esto se confirmó al realizar la gráfica de corriente de pico contra la raíz de la velocidad de barrido y observar que la relación era lineal. Ello indicó que lo que se detectaba en la etapa de redisolución era una especie presente en la interfase electrodo/solución y no una especie adsorbida. Esto podría explicarse ya sea por:

- 1) Que la adsorción del analito sobre el electrodo no es fuerte;
- 2) Que el analito difunde a una velocidad mayor a la que se realiza el barrido de potencial.

A partir de los resultados anteriores, en este trabajo se decidió emplear un método de determinación amperométrica directa. A pesar de que el valor del límite de detección de la polarografía de pulso normal y la cronoamperometría (23 y 21 μM , respectivamente) no alcanzan el valor para otras técnicas reportadas en la literatura [41-49], se encontró que para las condiciones del experimento, los métodos polarográficos constituyeron métodos apropiados para realizar la cuantificación del GSH. Lo anterior se justifica dado que la aplicación de ambos métodos es muy sencilla, además de que el tratamiento de la muestra biológica es mínimo.

6.7.2.4 Intervalo de trabajo e intervalo lineal

Como primera aproximación, mediante los experimentos de adiciones estándar de GSH sobre la muestra biológica, se observó que el sistema electroquímico en estudio presenta linealidad desde su límite de cuantificación hasta $4 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Tanto para polarografía de pulso normal como para cronoamperometría, se prepararon blancos de muestra fortificados con concentraciones desde $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ a $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ de GSH. Con ellos se realizó una curva de calibración de GSH, con el objetivo de encontrar el punto donde el sistema dejara de comportarse linealmente.

A partir del análisis de los coeficientes de correlación de ambas curvas, se confirmó que el sistema presenta linealidad en el intervalo en estudio (Figura 41). Dicho coeficiente es ligeramente mayor para polarografía de pulso normal, lo que nos indica que con este método hay una mejor correlación entre las concentraciones de GSH y la corriente registrada.

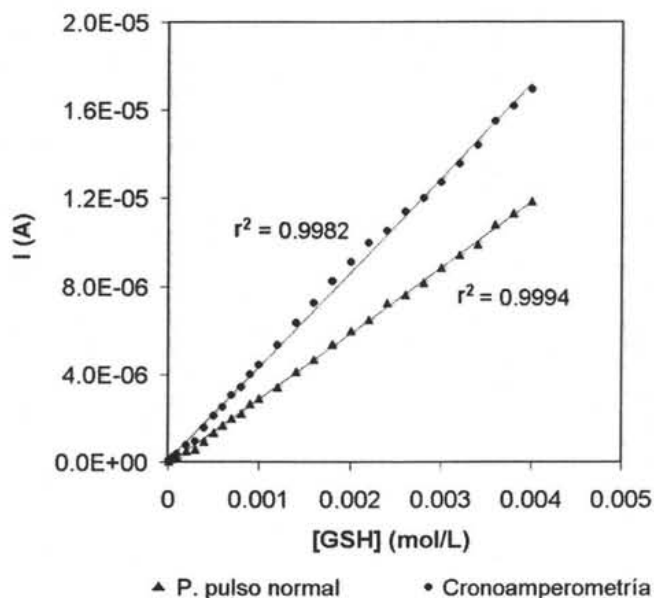


Figura 41. Intervalo lineal de los métodos estudiados. Mezcla 1:1 de amortiguador Dubelcco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones: 6.3 a 6.8. **P. pulso normal:** EGM (gota mediana). PI=-0.5 V; PF=0.4 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s. **Cronoamperometría:** EMGP (gota grande). PI=-0.3 V; E1=0.1 V; T1=1 s.

Para fines prácticos en el laboratorio, el intervalo de trabajo que cubre el intervalo de concentraciones requerido para los dos métodos polarográficos, se estableció desde su correspondiente límite de cuantificación hasta 1.2×10^{-3} M.

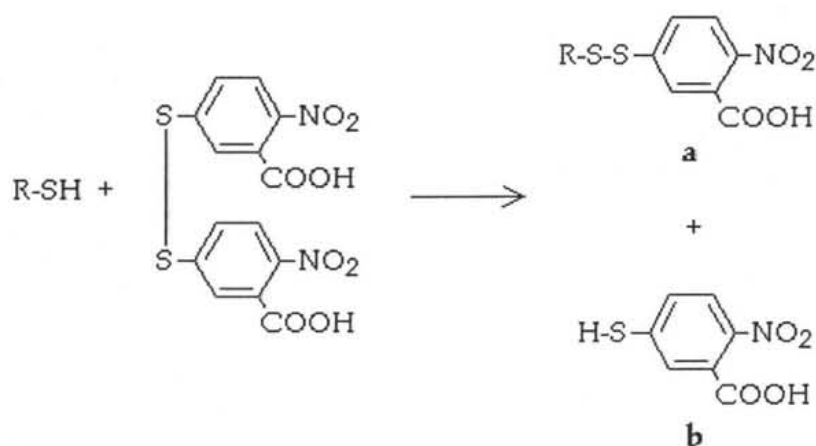
Cabe mencionar que, para la figura mostrada, en cronoamperometría se empleó el tamaño de gota grande del electrodo de mercurio (área 0.046 cm^2). Esto con el fin de comparar los intervalos lineales de ambos métodos en la misma figura. Si en cronoamperometría se selecciona el tamaño de gota mediano (área 0.014 cm^2), se obtienen curvas de calibración que casi se sobreponen. Esto indica que el valor establecido de 0.2 segundos como tiempo

de muestreo de corriente en cronoamperometría, fue elegido correctamente para comparar las señales obtenidas por ambas técnicas.

6.7.2.5 Exactitud

En ocasiones obtener un material certificado resulta complicado, debido a que las compañías dedicadas a proveer estándares certificados tienen limitaciones en la preparación de éstos y no son comerciales. Este es el caso del GSH. Por otro lado, fabricar un material de este tipo suele ser complicado debido a la complejidad que pudiese presentar la matriz y la heterogeneidad de sus componentes [50]. Además, se requiere caracterizar el material mediante pruebas interlaboratorio con diferentes analistas y diferentes técnicas, lo cual está fuera del alcance de este trabajo.

Debido a las limitaciones anteriores, la prueba de exactitud se realizó mediante la comparación con una técnica independiente, que en este caso fue un método espectrofotométrico -que aún no está validado- cuya determinación está basada en el método de Ellman [36]. En dicho método, el DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)) es reducido por los grupos tiol (SH) para formar un mol de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico por mol de tiol, de acuerdo a la siguiente reacción:



Donde el producto marcado como **b** tiene un color amarillo intenso y se puede emplear para monitorear los grupos tiol. Dicho método ha sido empleado en la determinación de GSH en sangre de ratas hembra de la cepa Wistar [51].

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos con la técnica de cuantificación por adiciones estándar para polarografía de pulso normal y cronoamperometría, donde los resultados se reportan en nmol de GSH por mg de proteína. La exactitud de ambos métodos polarográficos se reporta como el promedio de los 7 experimentos y es comparado con el obtenido por el método espectrofotométrico. Este último emplea la técnica de cuantificación por curva de calibración (ver **Anexo 4**). En la tabla se reporta también el error estándar promedio obtenido a partir de los 7 experimentos independientes.

Tabla 14. Contenido de GSH en los homogenizados de cerebro de rata Wistar

Exper.	[GSH] (nmol/mg proteína)		
	<i>P. pulso normal</i>	<i>Cronoamperometría</i>	<i>UV-Visible</i>
1	38	32	30
2	30	26	29
3	29	26	30
4	29	32	35
5	31	34	25
6	31	26	29
7	29	35	34
prom.	31 ± 1.2	30 ± 1.5	30 ± 1.3

En la tabla anterior se observa que el error estándar promedio es relativamente mayor en la cronoamperometría, lo indica que en este método las determinaciones fluctuaron en un intervalo más grande, comparado con la polarografía de pulso normal y la técnica espectrofotométrica. Sin embargo, mediante una prueba de hipótesis de Student-Newman-Keuls se encontró que el promedio determinado por las tres técnicas es igual estadísticamente.

En la Tabla 15 se muestran los datos obtenidos al realizar el análisis de varianza de una vía, seguida de la prueba de hipótesis de Student-Newman-Keuls. Al comparar las sumas de cuadrados, se observó que la variación entre métodos es menor que la variación dentro de un método. Al aplicar el estadístico F con un nivel de confianza del 95% se encontró que no hay diferencia estadística significativa entre el promedio reportado por los tres métodos ($F_{\text{experimental}} < F_{\text{calculada}}$). Esto permitió confirmar que las determinaciones con los métodos polarográficos presentan exactitud al ser comparadas con el método espectrofotométrico.

Tabla 15. Análisis de varianza de una vía para los datos de contenido de GSH en los homogenizados de cerebro de rata Wistar para los tres métodos en estudio

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_{exp}	F_{calc} ($\alpha=0.05$)
Entre métodos	2.952	2	1.476	0.117	0.890
Error	226.286	18	12.571		
Total	229.238	20			

Cabe mencionar que si en los métodos polarográficos se calcula el contenido de GSH mediante la curva de calibración promedio realizada para el estudio de sensibilidad, se obtienen lecturas de GSH mayores. Sin embargo, este tipo de cuantificación no incluye los

efectos de matriz en el análisis, que deben ser muy importantes debido a la composición tan diversa de un material biológico.

Por otro lado, el contenido de glutatión en cerebro de rata de la cepa Wistar que se ha reportado en los distintos artículos, va desde 1.6 hasta 51.9 nmol/mg proteína [11-21]. Esto permite decir que el dato encontrado en el presente trabajo está dentro del intervalo reportado en la literatura para material biológico proveniente del cerebro de rata Wistar.

6.7.2.6 Incertidumbre de medición

Este parámetro se determinó calculándose el intervalo de confianza de la exactitud del método, a partir de la *ecuación 10* [52]:

$$x \pm t_{(n-2)} S_{XE} \quad (\text{ecuación 10})$$

Donde x es la concentración calculada mediante la técnica de adiciones estándar, t es el estadístico de Student leído al 95% de confianza con $n-2$ grados de libertad y S_{XE} es el error asociado a la concentración calculada, el cual a su vez se calcula de la siguiente forma:

$$S_{XE} = (S_{Y/X}/b) \sqrt{(1/n) + (\bar{y}^2/b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2)} \quad (\text{ecuación 11})$$

Donde b es la pendiente de la curva de calibración por la técnica de adiciones estándar y $S_{Y/X}$ es el estadístico que estima los errores aleatorios en la dirección y , calculado con la *ecuación 12*:

$$S_{Y/X} = \sqrt{(y_i - \hat{y}_i)^2 / n-2} \quad (\text{ecuación 12})$$

A partir de las ecuaciones anteriores, se calculó el intervalo de confianza de cada uno de los experimentos, y se obtuvo un intervalo de confianza promedio para los dos métodos polarográficos. El intervalo de confianza del método espectrofotométrico se calculó multiplicando el error estándar promedio por el estadístico t de Student a un nivel de confianza del 95% y 6 grados de libertad ($t=2.447$).

Con ello, se elaboró la Tabla 16, donde puede verse que el intervalo de confianza promedio para la polarografía de pulso normal es menor que para la cronoamperometría. Esto nos indica que el primero es un método más preciso que el segundo, aunque el experimento involucra un tiempo de realización mayor. Además, el método espectrofotométrico es el que presenta una menor dispersión de los datos, ya que su intervalo de confianza es el más pequeño de los tres métodos comparados.

Tabla 16. Promedio e intervalo de confianza del contenido de GSH en los homogenizados de cerebro de rata Wistar mediante los tres métodos estudiados

	[GSH] (nmol/mg proteína)		
	<i>P. pulso normal</i>	<i>Cronoamperometría</i>	<i>UV-Visible</i>
promedio	31 ± 5	30 ± 8	30 ± 3

Comparado con los datos reportados, el intervalo de confianza encontrado en este trabajo con ambos métodos polarográficos, es grande. Además de que la mayoría de los artículos han logrado reportar contenidos de GSH hasta con décimas de nmol, lo que no se pudo alcanzar en este trabajo. Sin embargo, el contenido promedio de GSH obtenido con ambos métodos polarográficos, se encuentra dentro del intervalo reportado para GSH en cerebro de rata Wistar, determinado ya sea por métodos espectrofotométricos, de fluorescencia o de HPLC-espectrofotométrico [11-21].

Cabe mencionar que el cálculo de incertidumbre suele involucrar más variables. El realizar un estudio exhaustivo de la incertidumbre involucra realizar pruebas interlaboratorio, análisis con diferentes analistas, en tiempos diferentes y con una muestra certificada, entre otras cosas, lo cual está fuera del alcance de este trabajo. Sin embargo, el intervalo de confianza calculado aquí constituye una primera aproximación.

6.7.2.7 Sensibilidad

Este parámetro se reporta como la pendiente de la curva de calibración, para lo cual se construyeron 5 curvas de calibración en el intervalo de trabajo y se realizó la gráfica de las curvas promedio tanto para la polarografía de pulso normal (Figura 42) como para la cronoamperometría (Figura 43). Se puede ver en las figuras que la sensibilidad de ambos métodos es similar. Cabe mencionar que en las curvas promedio se omitieron los puntos aberrantes mediante la construcción de los cinturones de confianza, para un nivel de confianza del 95% y 13 concentraciones distintas de GSH. En comparación con la sensibilidad del método espectrofotométrico ($1.278 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), la sensibilidad de los métodos polarográficos es menor (alrededor de $3 \times 10^{-3} \text{ AM}^{-1}$). Sin embargo, los datos de la Tabla 16 y la prueba de hipótesis de Student-Newman-Keuls mostraron que los métodos polarográficos son tan exactos como el método espectrofotométrico.

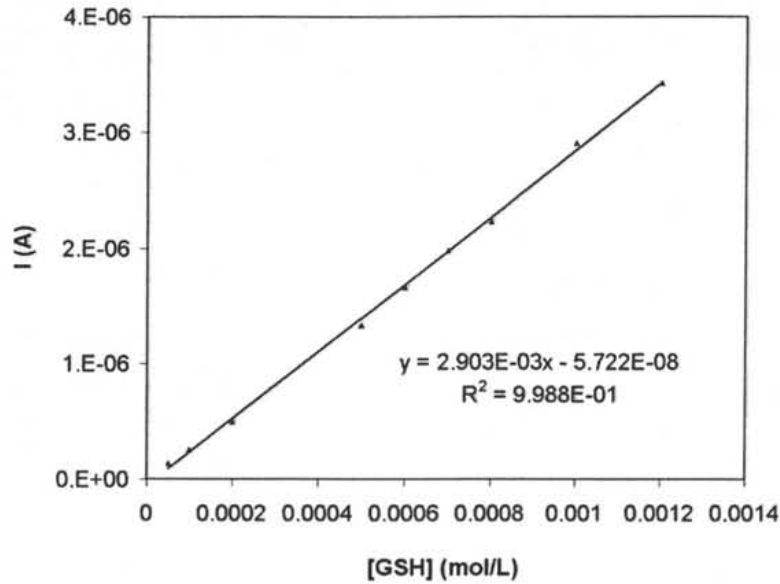


Figura 42. Curva de calibración promedio de GSH por *polarografía de pulso normal*. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones: 6.3 a 6.7. EGM. PI= -0.5 V; PF=0.4 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

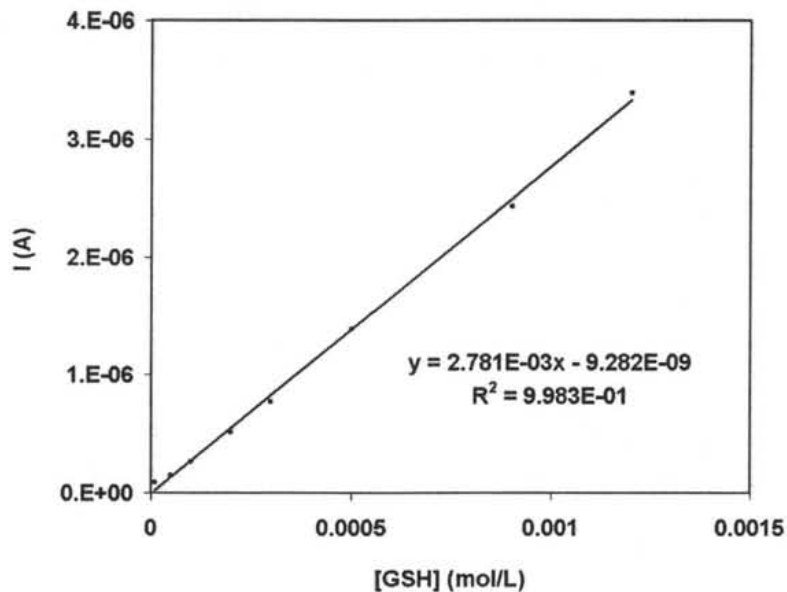


Figura 43. Curva de calibración promedio de GSH por *cronoamperometría*. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones: 6.3 a 6.7. EMGP (gota mediana). PI=-0.3 V; E1=0.1 V; T1=1 s.

6.7.2.8 Recuperación

Este parámetro se determinó a partir de cinco experimentos con el cerebro de rata. Las muestras se fortificaron con 100 μ L de estándar de GSH 0.025M y se siguió la técnica de adiciones estándar. El porcentaje de recuperación se calculó a partir de la *ecuación 13* [29]:

$$\% R = [(C_1 - C_2)/C_3] * 100 \quad (\text{ecuación 13})$$

donde C_1 es la concentración determinada en la muestra fortificada,

C_2 es la concentración determinada en la muestra sin fortificar, y

C_3 es la concentración de fortificación

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos para las dos técnicas electroquímicas y la espectrofotométrica, donde se observa que el porcentaje de recuperación para los tres métodos es similar. La evaluación de este parámetro fue importante, ya que se pudo confirmar que en los tres métodos empleados la recuperación del GSH es similar. Con lo anterior, los datos de cuantificación de GSH en los homogenizados de cerebro con los tres métodos resultaron confiables y comparables.

Tabla 17. Porcentaje de recuperación promedio para los tres métodos estudiados

% Recuperación		
<i>P. pulso normal</i>	<i>Cronoamperometría</i>	<i>UV-Visible</i>
94	93	95

6.7.2.9 Robustez

En la Figura 44 se muestra un diagrama causa-efecto de los parámetros identificados y que requieren ser evaluados para la optimización de los métodos polarográficos desarrollados en este trabajo. Los principales parámetros a controlar y que afectan la forma y tamaño de la señal electroquímica del GSH se encuentran en letras mayúsculas. Cabe mencionar que el proceso de desarrollo y validación de un método es un proceso dinámico y no está restringido a un procedimiento estricto.

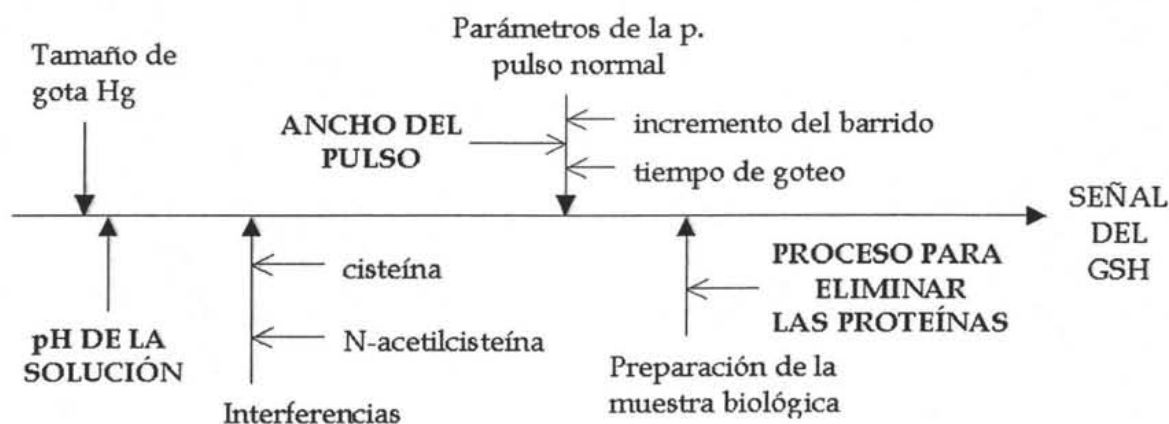


Figura 44. Diagrama causa-efecto sobre la señal del GSH en los métodos polarográficos estudiados.

Con el propósito de analizar las variables que tienen un efecto significativo sobre la forma y tamaño de la señal polarográfica se dividieron en dos bloques:

a) Aquellas relacionadas con los parámetros propios de la polarografía de pulso normal, por ejemplo el incremento del barrido, el tiempo de goteo, el ancho de pulso, etc. Como se observó en la sección 6.4, el hecho de modificar la anchura del pulso de potencial hace que varíen el ancho y la altura de la señal, mientras que el incremento del barrido y el

tiempo de goteo no muestran un efecto considerable sobre la forma de la señal, pero sí en la duración del experimento. Otro parámetro de importancia es el pH de la solución, ya que a valores de pH mayores a 8 el sistema del glutatión deja de presentar reversibilidad, como se estudió en la secciones 6.3.1 y 6.3.2.

b) Dentro de las variables relacionadas con la preparación de la muestra biológica, debe tenerse consideración especial con el agente que se emplea para precipitar las proteínas. Aunque se ha reportado que el ácido tricloroacético es un agente precipitante recomendable para tejidos biológicos [53], provoca la oxidación del GSH. Esto ocasionó que al llevar a cabo el análisis en la muestra biológica, no se apreciara la señal del analito. Se intentó emplear también el ácido fosfórico, pero no resultó ser adecuado porque la señal del analito se deformaba de manera significativa, probablemente por una adsorción favorecida por este compuesto. Finalmente, para el método desarrollado en este trabajo, el agente precipitante de proteínas adecuado para llevar a cabo la preparación de la muestra fue el ácido metafosfórico (HPO_3), ya que es un ácido con menor poder oxidante que el ácido tricloroacético [3].

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Dado que los compuestos tiólicos son especies electroactivas en el electrodo de mercurio, la señal polarográfica del glutatión permitió establecer una metodología analítica mediante polarografía de pulso normal y cronoamperometría para evaluar el contenido de dicho analito en una matriz biológica. Debe aclararse que estos métodos no fueron selectivos para la determinación de glutatión sino para determinar el contenido de tioles totales; sin embargo se ha reportado que el glutatión es el tiol de mayor concentración intracelular, por lo que la señal estudiada correspondió principalmente a la respuesta del glutatión, con lo que el resto de las conclusiones toman en cuenta esta consideración. Además, los métodos fueron específicos para la determinación de tioles en la muestra biológica. Cabe mencionar que deben hacerse más pruebas para realizar una validación completa de los métodos, dentro de las que se encuentran el determinar la concentración de cisteína en la muestra biológica por una técnica alterna (ya que es poco soluble en agua) y realizar la evaluación de otros parámetros de desempeño de los métodos, como las pruebas interlaboratorio, por ejemplo. Sin embargo, este trabajo constituye una herramienta útil con miras a realizar la validación de los métodos desarrollados.

Por otro lado, el contenido de glutatión en cerebro total de rata Wistar determinado mediante polarografía de pulso normal y cronoamperometría (31 y 30 nmol/mg proteína, respectivamente), se encuentra dentro del intervalo reportado en la literatura, el cual va de 1.6 a 51.9 nmol GSH/mg proteína. Estos datos se compararon con los obtenidos por un método espectrofotométrico independiente, que aunque no ha sido validado, se empleó para confirmar los datos obtenidos con los métodos polarográficos, ya que no se disponía de un material de referencia certificado.

Finalmente, se encontró que la polarografía de pulso normal constituyó un método más preciso para la determinación de glutatión que la cronoamperometría. Sin embargo la cronoamperometría constituyó un método más eficiente para la determinación de glutatión que la polarografía de pulso normal. Esto debido a que el gasto de mercurio que generó la cronoamperometría es menor y el tiempo en el que se realizaron los experimentos fue mucho más corto.

VIII. PERSPECTIVAS

- 1) Con los métodos polarográficos estudiados en este trabajo, determinar el contenido de glutatión en cerebro de rata diabética y compararlo con el de un animal sano.

- 2) Con los métodos polarográficos estudiados en este trabajo, determinar el contenido de glutatión en cerebro de rata con Parkinson y compararlo con el de un animal sano.

- 3) Establecer una relación entre el contenido de glutatión y el grado de estrés oxidativo en el cerebro de rata.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Dringen, R. *Progress in Neurobiology*. **2000**, *62*, 649-671.
2. Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M.R. *Biochemical Pharmacology*. **2002**, *64*, 1057- 1064.
3. Rebrin, I.; Kamzalov, S.; Sohal, S. *Free Radical Biology and Medicine*. **2003**, *35*, 6, 626-635.
4. Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Colombo, R.; Milzani, A.; Russi, R. *Free Radical Biology and Medicine*. **2003**, *35*, 11, 1365-1372.
5. Larwance, S.N.; Davis, J.; Compton, R.G. *Talanta*. **2001**, *52*, 1089-1094.
6. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2a. edición. Wiley & VCH. Nueva York, **2000**.
7. Skoog, D.; Holler, J.; Nieman T. *Principios de Análisis Instrumental*, 5a. Edición. Mc Graw Hill, España, **2001**.
8. Bard, A.; Faulkner, L. *Electrochemical Methods*, 2a. edición. John Wiley & Sons. E.U.A., **2001**.
9. Bharath, S.; Hsu, M.; Deepinder, K.; Rajagolapan, S.; Andersen, J.K. *Biochemical Pharmacology*. **2002**, *64*, 1037-1048.
10. Nicholson, R.; Shain, I. *Analytical Chemistry*. **1964**, *36*, 4, 706-723.
11. Sahin, E.; Gümüslü, S. *Behavioural Brain Research*. **2004**, *155*, 241-248.
12. Liu, J.; Yeo, H.; Övervik-Douki, E.; Hagen, T.; Diniger, S.; Chu, D.; Brooks, G.; Ames, B. *Journal of Applied Physiology*. **2000**, *89*, 21-28.
13. Abubakar, M.; Taylor, A.; Ferns, A. *African Journal of Biotechnology*. **2004**, *3*, 1, 88-93.
14. Slyshenkov, V.; Shevalye, A.; Liopo, A.; Wojtczak, L. *Acta Biochimica Polonica*. **2002**, *49*, 4, 907-913.
15. Shivarajashankara, Y.M.; Shivashankara, A.R.; Gopalakrishna Bhat, P.; Hanumanth Rao, S. *Fluoride*. **2002**, *35*, 3, 197-203.
16. García, V.; López, C.; Juanes de la Peña, M.; Medina, J. *Brain Research*. **2004**, *1001*, 159-163.

17. Calibrese, V.; Renis, M.; Calderone, A.; Russo, A.; Reale, S.; Barcellona, M.; Rizza, V. *Free Radical Biology and Medicine*. **1998**, *24*, 7/8, 1159-1167.
18. Sharma, Y.; Bashir, S.; Irshad, M.; Datta, S.; Dogra, T. *Toxicology*. **2005**, *206*, 49-57.
19. Dringen, R.; Hamprecht, B. *Developmental Neuroscience*. **1998**, *20*, 401-407.
20. Tyurin, V.; Taurina, Y.; Borisenko, G.; Sokolova, T.; Ritov, V.; Quinn, P.; Rose, M.; Kochanek, P.; Graham, S.; Kagan, V. *Journal of Neurochemistry*. **2000**, *75*, 5, 2178-2189.
21. Kim, S.; Cho, I.; Gu, H.; Lee, D.; Lim, H.; Yoo, S. *European Journal of Pharmacology*. **2004**, *487*, 81-91.
22. Ceriello, A. *Metabolism*. **2000**, *49*, 2, 27-29.
23. Baynes, J.W. *Diabetes*. **1999**, *48*, 1-9.
24. Baynes, J.W. *Diabetes*. **1991**, *40*, 405-412.
25. Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*. **2003**, *17*, 1, 24-38.
26. West, I.C. *Diabetic Medicine*. **2000**, *17*, 171-180.
27. Tsai, E.C.; Hirsch, I.B.; Brunzell, J.D.; Chait, A. *Diabetes*. **1994**, *43*, 8, 1010-1014.
28. ISO 8402:1994. Quality – Vocabulary. ISO Geneva, Switzerland, **1994**.
29. EURACHEM Guide. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. LGC, Teddington, United Kingdom, **1998**.
30. NATA – Technical Note # 13 "Requirements for the Format and Content of Test Methods and Recommended Procedures for the Validation of Test Methods".
31. AOAC Peer Verified Methods Program – *Manual on policies and procedures*. AOAC International, Airlington VA 22201-33, E.U.A., **2000**.
32. ISO 3534-1:1993. "Statistics-Vocabulary and symbols- Part 1: Probability and general statistical terms". ISO, Geneva, **1993**.

33. ISO VIM. *International Vocabulary of Basic and Generated Terms in Metrology*, 2nd edition. ISO, Geneva **1993**.
34. ICH Topic Q2A - *Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95)*. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.
35. *Técnicas in vitro para el estudio de fármacos antiinflamatorios*. CYTED Subprograma X Proyecto X.6. San José, Costa Rica, **2002**.
36. Sedlak, J.; Lindsay, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *74*, 443, 192-205.
37. Lowry, H.; Rosebrough, J.; Farr, L.; Randall, J. *Journal of Biological Chemistry.* **1951**, *193*, 265-275.
38. Stricks W; Kolthoff, I.M.. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4646-4653.
39. Seymour, H.; Wilkins, S.; Lawrence, N.; Compton, R. *Analytical Letters.* **2002**, *35*, 8, 1387-1399.
40. White, P.; Lawrence, N; Davies, J.; Compton, R. *Electroanalysis.* **2000**, *14*, 89-108.
41. Rabenstein, D.; Yamashita, G. *Analytical Biochemistry.* **1989**, *180*, 259-263.
42. Yang, C.; Tsai, P.-J.; Chen, W.; Liu, L.; Kuo, J. *Journal of Chromatography B.* **1995**, *667*, 41-48.
43. Ohkuwa, Y.; Sato, N.; Naoi, M. *Journal of Chromatography B.* **1998**, *705*, 23-28.
44. O'Shea, T.; Lunte, S. *Analytical Chemistry.* **1993**, *65*, 247-252.
45. Jin, W.; Wang, Y. *Analytica Chimica Acta.* **1997**, *343*, 231-239.
46. Le Gall, A.; Van der Berg, C. *Analyst.* **1993**, *118*, 1411-1415.
47. Von Wandroska R.; Yuan, X.; Morra, J. *Talanta.* **1993**, *40*, 37-42.
48. Banica, F.; Moreira, J.; Fogg, A. *Analyst.* **1994**, *119*, 309-314.
49. Banica, F.; Fogg, A.; Moreira, J. *Analyst.* **1994**, *119*, 2343-2348.
50. Cruz, J.L. *Desarrollo y validación de una metodología electroquímica para determinar cromo hexavalente en muestras de matriz compleja*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2003**.
51. López, A. *Evaluación del efecto de los extractos de Physalis Chenopodifolia Lam sobre los niveles de glucosa, peroxidación de lípidos y glutatión en sangre de*

- ratas normales y diabéticas*. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas, UAM-Xochimilco, **2004**.
52. Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Prentice may, 4ª. Edición, **1999**.
53. Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardo, F.V.; Lloret, A.; Lehener, M.; García-de-la Asunción, J.; Viña, J. *Methods in Enzymology*. **1999**, 299, 267-276.
54. Philip Jesudason, E.; Gunasingh Masilamoni, J.; Samuel Jesudoss, K.; Jayakumar, R. *Molecular and Cellular Biocemistry*. **2005**, 270,1&2, 29-37.
55. Ziqiang Meng; Bo Zhang. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **2003**, 13,1, 1-8.

Sitio en Internet para obtener EURACHEM GUIDE & OTHERS DOCUMENTS:

<http://www.eurachem.ul.pt/guidesanddocuments.htm>

X. ANEXOS

ANEXO 1: Estabilidad de la señal del glutatión en la muestra biológica

Con el fin de averiguar la estabilidad de la señal electroanalítica del glutatión en la muestra biológica a temperatura ambiente por la técnica de polarografía de pulso normal, se detectó la señal del analito en el homogenizado recién preparado (secciones 5.2 y 5.2.2), cuando transcurrieron 4 horas y 9 horas después de su preparación. En la Figura 45 se muestran los polarogramas obtenidos para cada tiempo, mientras que en la Tabla 18 se indican los valores de corriente registrados.

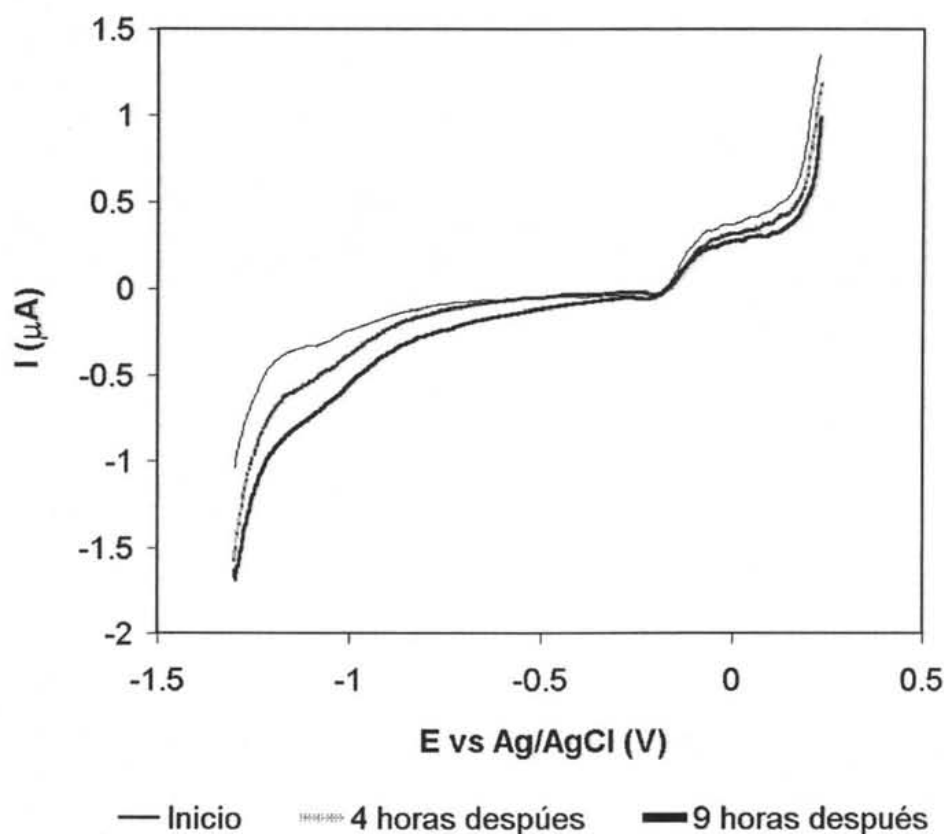


Figura 45. Intensidad de la señal del glutatión en la muestra biológica en función del tiempo a temperatura ambiente. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones: 6.4. EGM. PI= -1.3 V; PF=0.23 V; SI=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

Tabla 18. Intensidad de la señal del glutatión en la muestra biológica en función del tiempo a temperatura ambiente

Tiempo transcurrido (horas)	Intensidad de la señal analítica (I, μA)	% de la señal inicial
0	0.4046	
4	0.3421	85%
9	0.3148	78%

Como puede observarse, conforme avanza el tiempo, la intensidad de la señal del analito disminuye conforme el tiempo se incrementa, por lo que es importante realizar el estudio lo más pronto posible una vez que se ha preparado la muestra biológica con el fin de manipularla lo menos posible a temperatura ambiente o bien mantenerla en refrigeración alrededor de -73°C mientras no se está trabajando con ella.

ANEXO 2: Curva de calibración de la albúmina bovina por un método espectrofotométrico

Para construir la curva de calibración de albúmina sérica bovina se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se preparó 1 mL de solución de albúmina sérica bovina de concentración 1.5 mg/mL
- 2) Se tomaron las alícuotas de la solución de albúmina 1.5 mg/mL indicadas en la tabla 19.

Tabla 19. Volumen de las alícuotas de albúmina empleadas en la construcción de la curva de calibración

Alícuota de albúmina 1.5 mg/mL (μL)	Volumen de agua desionizada (μL)	Concentración de albúmina en los 400 μL ($\mu\text{g/mL}$)
0	400	0
20	380	75
40	360	150
60	340	225
80	320	300
100	300	375
120	280	450
140	260	525
160	240	600

- 3) Los 400 μL de las soluciones anteriores se colocaron en un frasco con tapa
- 4) Se agregó a cada frasco 2.3 mL de la siguiente mezcla:
 - 49 mL de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 M
 - 0.5 mL de tartrato de sodio potasio al 2%
 - 0.5 mL de CuSO_4 al 1%

- 5) Transcurridos 10 minutos, se agregaron 0.3 mL de reactivo de Folin disuelto en agua desionizada 1:1 y se agitó la solución.
- 6) A los 30 minutos se midió la absorbancia a 550 nm.
- 7) Para determinar el contenido de proteínas en la muestra biológica, se tomaron 10 μL del sobrenadante obtenido en la sección 4.8 y se mezclaron con 390 μL de agua desionizada.
- 8) Se agregaron 2.3 mL de la mezcla de Na_2CO_3 , CuSO_4 y tartrato de sodio potasio y se dejó reposar la solución durante 10 minutos.
- 9) Posteriormente se agregaron 0.3 mL del reactivo de Folin y pasados los 30 minutos se midió la absorbancia a 550 nm. La lectura de absorbancia se interpoló en la curva de calibración mostrada a continuación (Figura 46).

Tabla 20. Datos para construir la curva de calibración de la albúmina

[Albúmina] ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (550 nm)
10	0.10525
20	0.2025
30	0.28875
40	0.3675
50	0.43345
60	0.53275
70	0.6150
80	0.6900

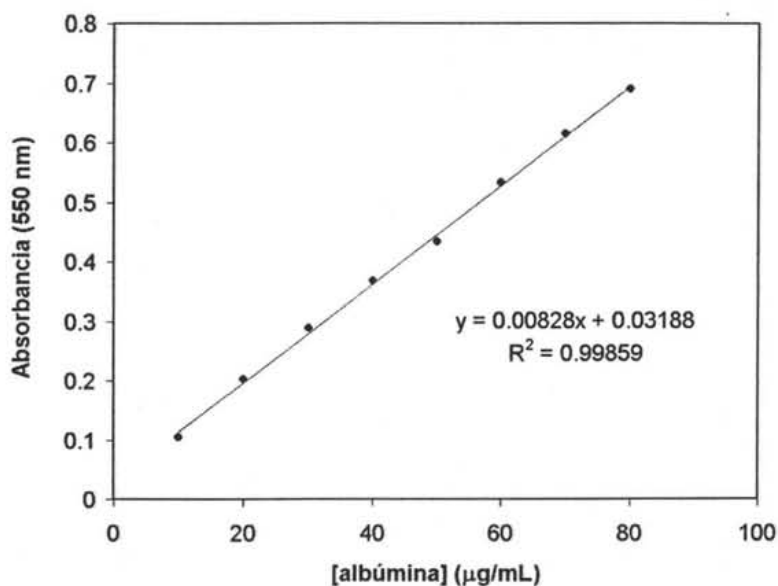


Figura 46. Curva de calibración de la albúmina bovina

ANEXO 3: determinación del contenido de glutatión en los homogenizados de cerebro de rata con la técnica de adiciones estándar (para los dos métodos polarográficos estudiados)

Para construir la curva de adiciones estándar de glutatión, se siguieron los siguientes pasos:

- 1) En una celda de trabajo mantenida en hielo, se colocaron 1550 μL de la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, junto con 0.16g de NaOH.
- 2) Una vez disuelto el NaOH, se agregaron 1.8 mL del sobrenadante de la muestra biológica, obtenido de acuerdo al protocolo experimental (secciones 5.2 y 5.2.2).
- 3) La celda se colocó en el electrodo y la solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos.
- 4) Se aplicó el programa de perturbación de potencial descrito en las Tablas 3 y 4, para polarografía de pulso normal y cronoamperometría, respectivamente. Con ello se obtuvo la lectura para el glutatión en ausencia del estándar.
- 5) Se realizaron 10 adiciones de 14 μL de una solución estándar de glutatión 0.025 M, preparada en la mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%.
- 6) Se aplicó nuevamente el programa de perturbación de potencial mencionado anteriormente y se realizó la determinación del glutatión. Esto para cada una de las adiciones del estándar.
- 7) Se construyó la curva de calibración de adiciones estándar, con las concentraciones de glutatión de la Tabla 21.
- 8) Se calculó el contenido de glutatión mediante los parámetros de la ecuación de regresión de la curva obtenida, dividiendo la ordenada al origen entre la pendiente (Figuras 47 y 48).

Tabla 21. Concentración de las adiciones de estándar de glutatión en la muestra biológica

Volumen adicionado de GSH 0.025 M (μL)	Concentración de GSH estándar en la celda (mol/L)	I ($\times 10^{-6}$ A)	
		P. pulso normal	Cronoamperometría
0	0	0.3302	0.442
14	1.04×10^{-4}	0.6607	0.922
28	2.07×10^{-4}	1.0323	1.44
42	3.09×10^{-4}	1.3793	1.91
56	4.11×10^{-4}	1.7766	2.51
70	5.12×10^{-4}	2.1067	2.93
84	6.11×10^{-4}	2.4357	3.42
98	7.10×10^{-4}	2.7184	3.90
112	8.09×10^{-4}	3.0911	4.40
126	9.06×10^{-4}	3.3815	4.68
140	1.0×10^{-3}	3.6744	5.30

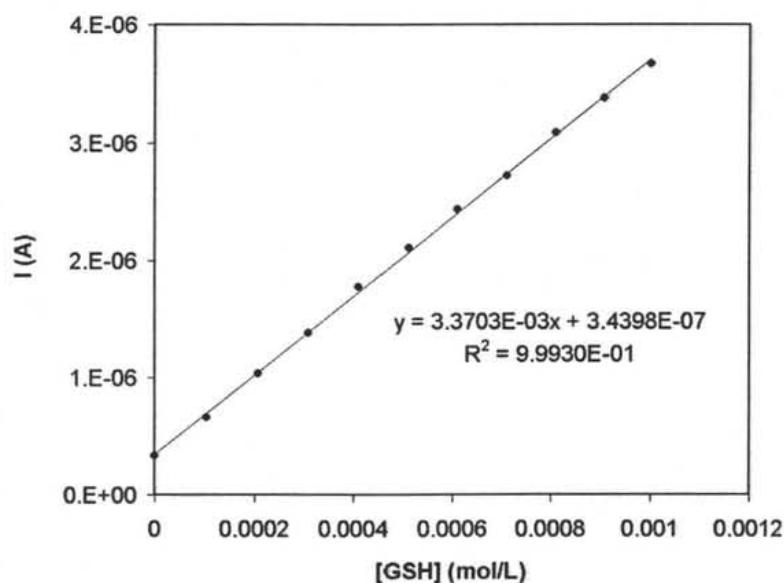


Figura 47. Curva de adiciones estándar de glutatión en polarografía de pulso normal. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones: 6.3 a 6.7. EGM. PI= -0.5 V; PF=0.4 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; DP=0.2 s.

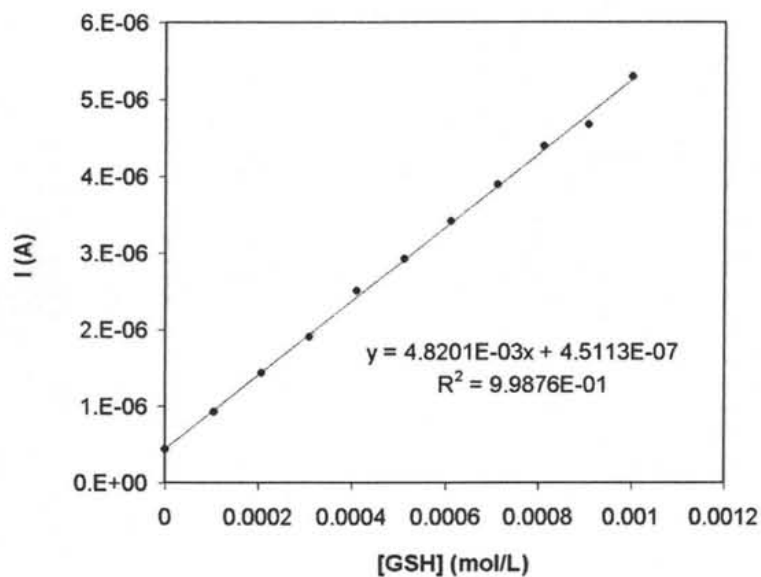


Figura 48. Curva de adiciones estándar de glutatión en cronoamperometría. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones: 6.3 a 6.7. EMGP (gota mediana). $PI = -0.3$ V; $E1 = 0.1$ V; $T1 = 1$ s.

ANEXO 4: Curva de calibración de glutatión determinada espectrofotométricamente

Para construir la curva de calibración de glutatión se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se prepararon 5 mL de una solución estándar de glutatión 5 mM en agua desionizada.
- 2) Se tomaron 4 mL de la solución anterior y se aforaron a 10 mL con amortiguador TRIS 0.4 M, pH 8.5 (concentración final 2 mM).
- 3) Se tomaron las alícuotas de la solución de GSH 2 mM señaladas en la Tabla 22 y se agregó el volumen indicado de amortiguador TRIS.

Tabla 22. Volumen de las alícuotas de glutatión empleadas en la construcción de la curva de calibración

Alícuota de GSH 2 mM (μL)	Volumen de TRIS 0.4 M, pH 8.5 (μL)	Concentración final de GSH (μM)
0	1000	0
10	990	10
20	980	20
30	970	30
40	960	40
50	950	50
60	940	60
70	930	70
80	920	80
90	910	90
100	900	100

- 4) Los 1000 μL de las soluciones anteriores se colocaron en un frasco con tapa
- 5) A cada frasco se agregaron 1000 μL de DTNB 1 mM en citrato de sodio al 1% y se agitó la solución.

- 6) Se midió la absorbancia a 412 nm, dentro de los primeros 5 minutos de reacción [36]. Con los datos de la Tabla 23 se construyó la curva de calibración del glutatión mostrada en la Figura 49. Por otro lado, en la Figura 50 se muestra la señal de absorbancia de una solución estándar de glutatión 240 μM .

Tabla 23. Datos para construir la curva de calibración del glutatión

Concentración de GSH (μM)	Absorbancia a 412 nm
0	0
10	0.1328
20	0.2497
30	0.3928
40	0.5155
50	0.6223
60	0.7710
70	0.8967
80	1.0268
90	1.1545
100	1.2748

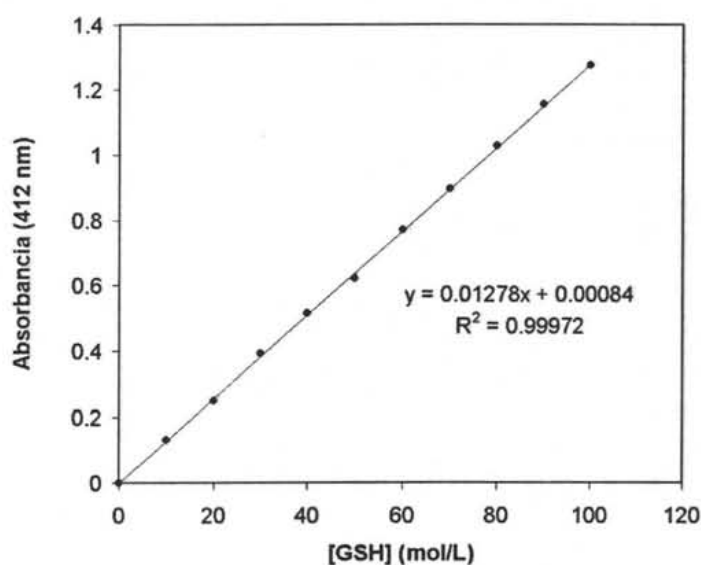


Figura 49. Curva de calibración de glutatión por el método espectrofotométrico

- 7) Para determinar el contenido de glutatión en la muestra biológica, se tomó una alícuota de 300 μL del sobrenadante descrito en la sección 4.8. Esta alícuota se mezcló con 1.5 mL de amortiguador TRIS, pH 8.5 y 1.8 mL de reactivo Ellman, agitando vigorosamente. El pH de esta solución fue 8.
- 8) La solución se transfirió a una celda espectrofotométrica para medir la absorbancia a 412 nm, en los primeros 5 minutos de reacción [36]. La lectura de absorbancia se interpoló en la curva de calibración descrita anteriormente. De esta forma se realizó la determinación del glutatión por el método espectrofotométrico para obtener la concentración de GSH.

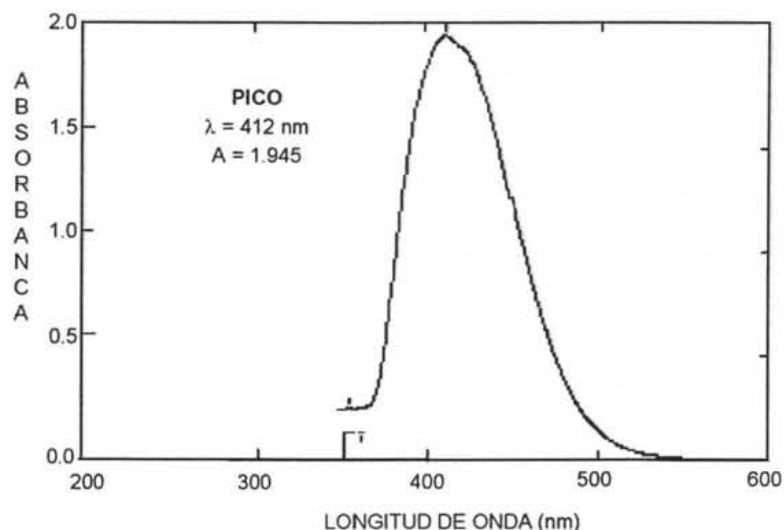


Figura 50. Longitud de onda para la señal del GSH en el método espectrofotométrico; $[\text{GSH}] = 240 \mu\text{M}$.

Anexo 5: Aplicación de la polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación del glutatión

Como primer paso, se procedió a optimizar los parámetros de esta técnica para la obtención de la señal polarográfica del glutatión. Para los experimentos que se describen en esta sección inicial se empleó como sistema una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en amortiguador de fosfatos pH 6.5. Con esta solución estándar se determinó el efecto que tuvo la variación de los parámetros de la polarografía diferencial de pulsos tales como el incremento de barrido, el tiempo de goteo, la altura y duración del pulso sobre la forma y tamaño de la señal polarográfica del GSH.

A. Variación de los parámetros propios de la polarografía diferencial de pulsos

En el seno de la celda de trabajo se prepararon 4 mL de una solución de GSH 8.3×10^{-4} M en amortiguador de fosfatos pH 6.5, a partir de una alícuota del estándar de GSH 0.025 M. La solución se desoxigenó con burbujeo de N_2 durante 10 minutos y posteriormente se realizó la determinación electroquímica del GSH, aplicando el siguiente programa de potencial:

Potencial inicial: -0.35 V vs Ag/AgCl

Potencial final: 0.25 V vs Ag/AgCl

Incremento del barrido: 6 mV

Tiempo de goteo: 1.2 s

Velocidad de barrido: 5 mV/s

Altura del pulso: 50 mV

Duración del pulso: 0.1 s

A partir de este programa de potencial se variaron los parámetros que se observan en la Figura 51 y también se describe la metodología empleada para realizar dicho estudio:

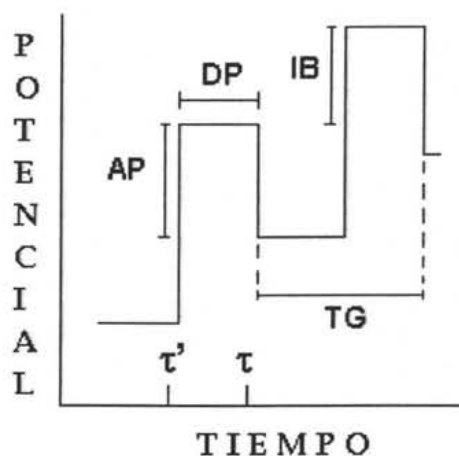


Figura 51. Perturbación de potencial en función del tiempo para polarografía diferencial de pulsos. IB=incremento del barrido; TG=tiempo de goteo; AP=altura del pulso; DP=duración del pulso.

A.1 Variación del incremento del barrido (IB)

Se modificó a 2, 8, 14 y 18 mV, manteniendo constantes el resto de los parámetros, a excepción del tiempo de goteo, ya que varía al mantener constante la velocidad de barrido. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

A.2 Variación del tiempo de goteo (TG)

Se modificó a 0.4, 0.8, 1 y 2 segundos, manteniendo constantes el resto de los parámetros, a excepción de la velocidad de barrido, que se modifica directamente al variar el tiempo de goteo. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

A.3 Variación de la altura del pulso (AP)

Se modificó a 25, 50, 100 y 150 mV, manteniendo constantes el resto de los parámetros. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

A.4 Variación de la duración del pulso (DP)

Se modificó a 0.025, 0.050, 0.1 y 0.2 segundos, manteniendo constantes el resto de los parámetros. Se estudiaron las señales polarográficas obtenidas.

B. Resultado de la modificación de los parámetros de la polarografía diferencial de pulsos

B.1 Incremento del barrido (IB)

Como se observa en la Figura 52, este parámetro tiene un efecto notable sobre el ancho y la altura de la señal, pues cuando tiende al valor máximo permitido por el equipo y el programa que lo controla (20 mV), la señal comienza a ensancharse y a disminuir su intensidad. Sin embargo, no deben elegirse valores tan pequeños de incremento del barrido como 2 mV, porque la línea base o de corriente residual se aleja del valor de corriente cero. Esto debido a que se presenta el fenómeno de adsorción del glutatión sobre el electrodo de mercurio que corresponde a la señal alrededor de -0.22 V [38]. Dicho fenómeno complica la lectura de corriente, dado que no se obtienen señales simétricas. Por lo anterior, aunque con incrementos del barrido cortos la sensibilidad de la señal es mayor, no deben elegirse valores demasiado cortos, ya que la velocidad de barrido podría hacerse muy lenta, ocasionando que la duración del experimento sea mayor.

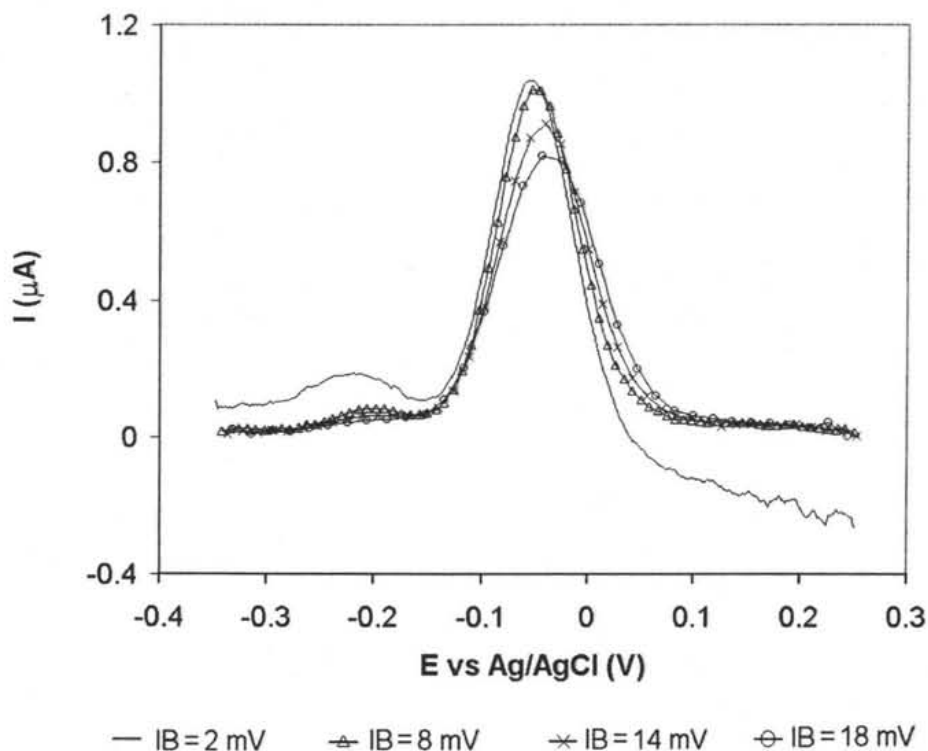


Figura 52. Modificando el incremento del barrido de potencial (IB, mV).
 [GSH]= 8.3×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5. EGM.
 PI=-0.35 V; PF=0.25 V; TG=1.2 s; AP=0.050 V; DP= 0.1 s.

B.2 Tiempo de goteo (TG)

Como en el caso de la polarografía de pulso normal, el efecto principal de este parámetro recae sobre la velocidad de barrido del experimento; esto se debe a que para un tiempo de goteo demasiado largo (mayor a 2 segundos) la velocidad de barrido se vuelve muy lenta, ocasionando que la duración del experimento sea mayor. Sin embargo, a tiempos de goteo menores a 0.8 segundos, como se observa en la Figura 53, la línea base o de corriente residual de la señal se aleja del valor de corriente cero. Esto debido a que se presenta el fenómeno de adsorción del glutatión sobre el electrodo de mercurio que

corresponde a la señal alrededor de -0.22 V) [38], lo que complica la lectura de corriente ya que no se obtienen señales simétricas.

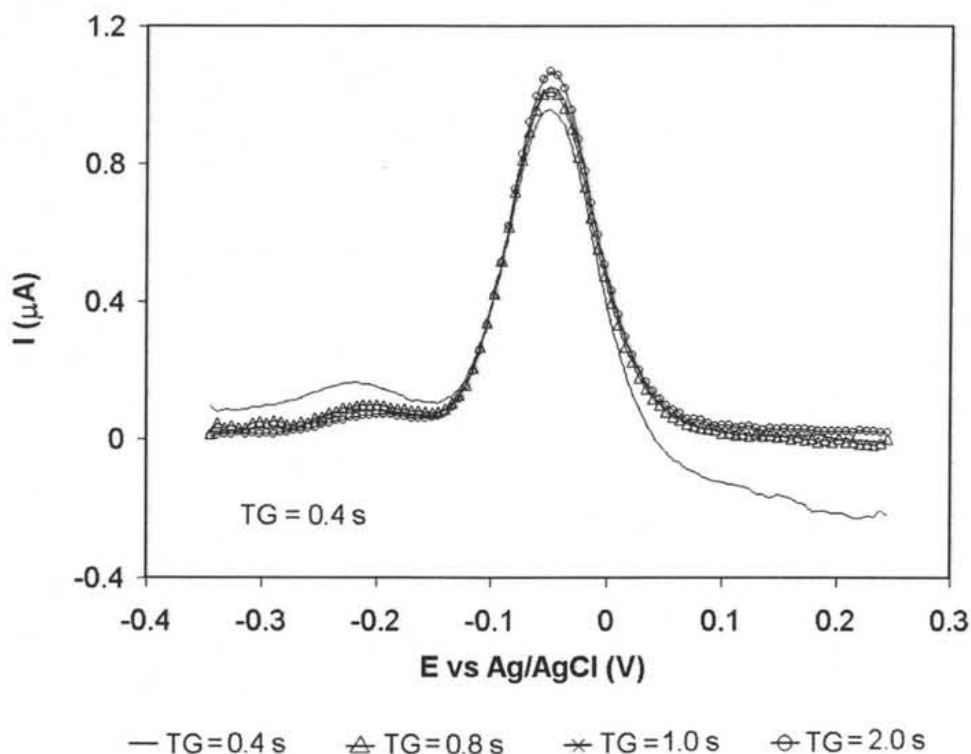


Figura 53. Modificando el tiempo de goteo (TG, s).
 [GSH] $=8.3 \times 10^{-4}$ M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5.
 EGM. PI $=-0.35$ V; PF $=0.25$ V; IB $=6$ mV; AP $=0.050$ V; AP $=0.1$ s.

B.3 Altura del pulso (AP)

Como se observa en la Figura 54, este parámetro es de gran interés, ya que a valores relativamente grandes de altura del pulso, el tamaño y la anchura de la señal aumentan, además de que la línea base se aleja del valor de corriente cero. Existe un compromiso entre la altura y el ancho de la señal polarográfica, pues señales excesivamente anchas

provocan pérdida en la resolución de las señales y no es conveniente. Sin embargo, una lectura de corriente mayor implica mejorar la sensibilidad del método. Por lo anterior, para elegir el valor adecuado de ancho del pulso se realizaron las gráficas de las Figuras 55 y 56.

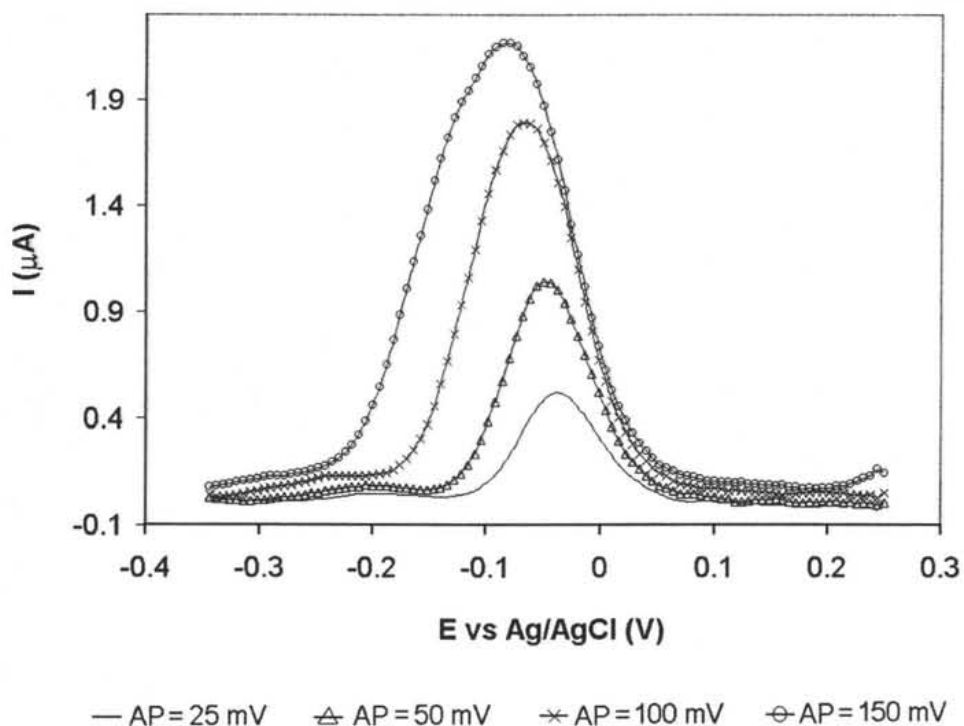


Figura 54. Modificando la altura del pulso (AP, mV).
[GSH]= 8.33×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5.
EGM. PI=-0.35 V; PF=0.25 V; IB=6mV; TG=1.2 s; DP=0.1 s.

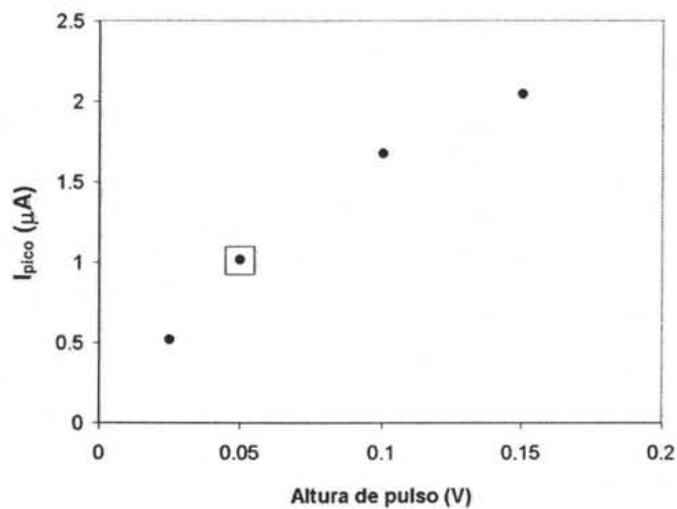


Figura 55. Gráfica de I_{pico} vs altura del pulso como un criterio para elegir el valor adecuado de altura del pulso en polarografía diferencial de pulsos.

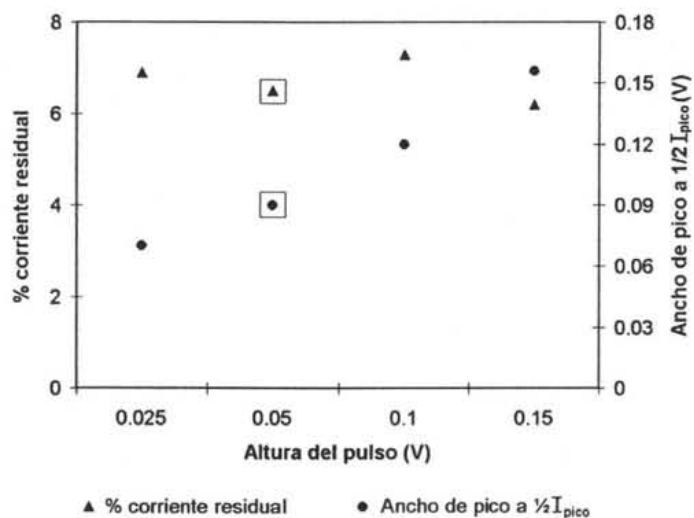


Figura 56. Gráfica de $\%I_{residual}$ y ancho de pico vs altura del pulso como un criterio para elegir el valor adecuado de altura del pulso en polarografía diferencial de pulsos.

A partir de las gráficas anteriores, se eligió el valor de ancho del pulso de 0.050 V, que corresponde a los puntos encerrados en un recuadro. Con este valor de altura del pulso la curva de I_{pico} vs potencial presenta un porcentaje relativamente bajo de corriente residual (Figura 56), así como un ancho de pico aceptable. En la Figura 55 se observa que este valor de ancho de pulso origina una señal con una intensidad de respuesta considerable.

B.4 Duración del pulso (DP)

Como se aprecia en la Figura 57 cuando este valor es relativamente grande (alrededor de 200 ms) el tamaño de la señal disminuye considerablemente, por lo que se eligen valores de ancho de pulso lo más pequeño que el equipo y el programa permitan.

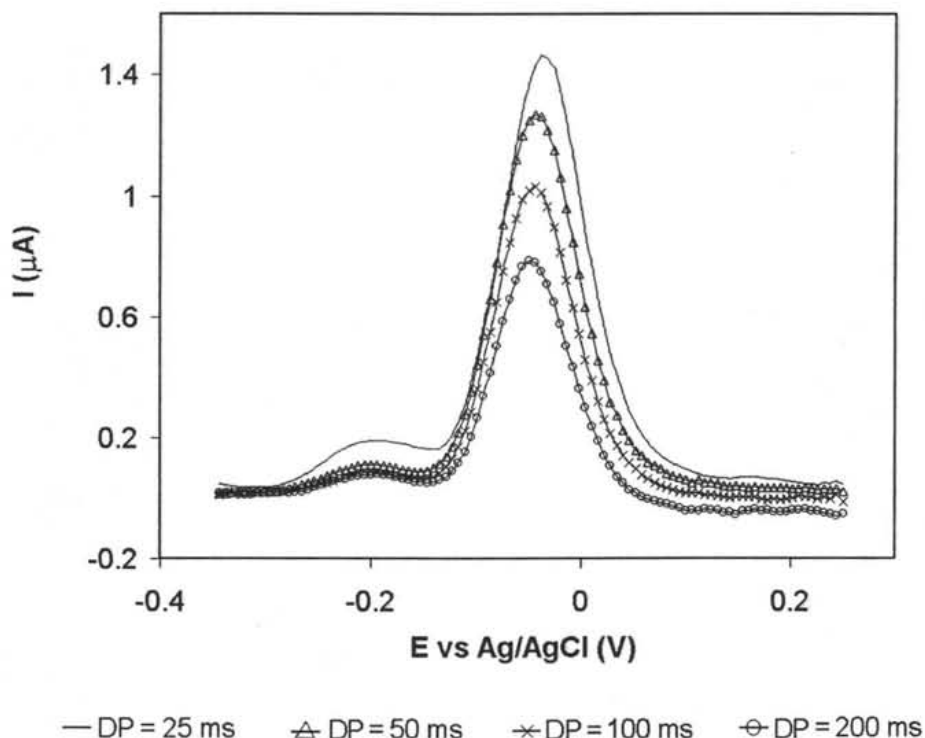


Figura 57. Modificando el ancho de pulso (DP, s).
[GSH] = 8.3×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.5.
EGM. PI = -0.35 V; PF = 0.25 V; IB = 6 mV; TG = 1.2 s; AP = 0.050 V

Con los experimentos anteriores, se seleccionaron los parámetros óptimos para detectar la señal del GSH. Estos afectan directamente el tiempo de realización del experimento, la altura y el ancho de la señal polarográfica. Una curva obtenida al emplear las condiciones seleccionadas se muestra en la Figura 58.

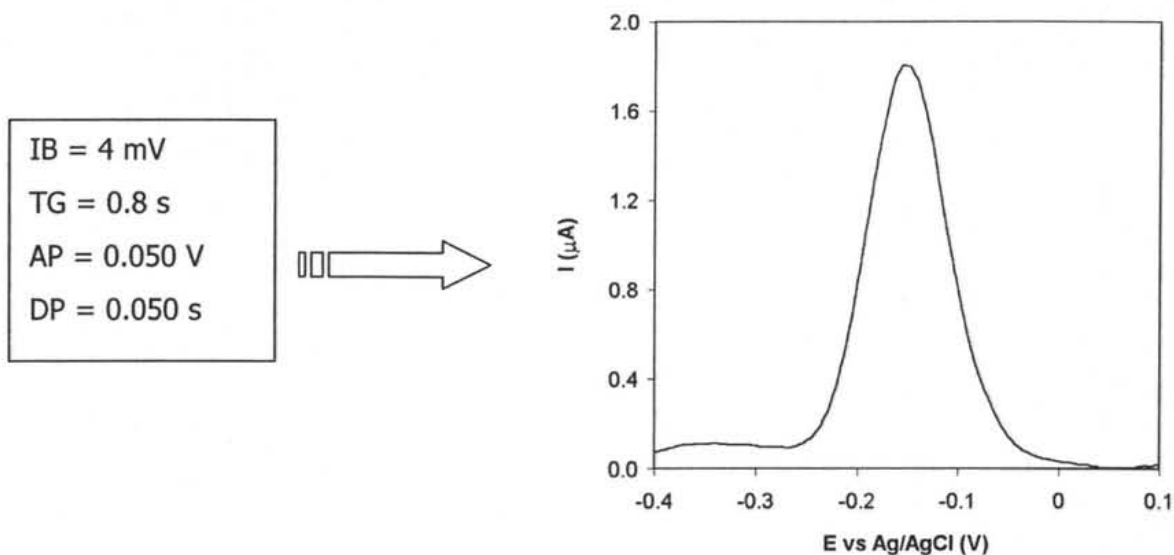


Figura 58. [GSH]= 8×10^{-4} M; amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.5. EGM

C. Aplicación de la polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación del GSH

Una vez elegidos los parámetros óptimos para detectar la señal del GSH con la técnica de diferencial de pulsos se realizó una curva de calibración de GSH. En la Figura 59 se muestra el perfil polarográfico de la curva de calibración del GSH; en ésta se nota que a concentraciones menores a 1×10^{-4} M se presenta sólo una señal alrededor de -0.25 V, que se ha relacionado con el fenómeno de adsorción del producto de la oxidación del GSH sobre el electrodo de mercurio, mientras que a concentraciones de 1.5 a 2.5×10^{-4} M existen dos señales, una a -0.25 V y la otra a -0.1 V aproximadamente, donde esta última

señal está relacionada con el proceso de difusión del analito hacia el electrodo. Para las concentraciones de 3×10^{-4} a 5×10^{-4} M predomina el pico alrededor de -0.1 V, y para las concentraciones mayores a 5×10^{-4} M sólo se observa la señal que se atribuye a la difusión.

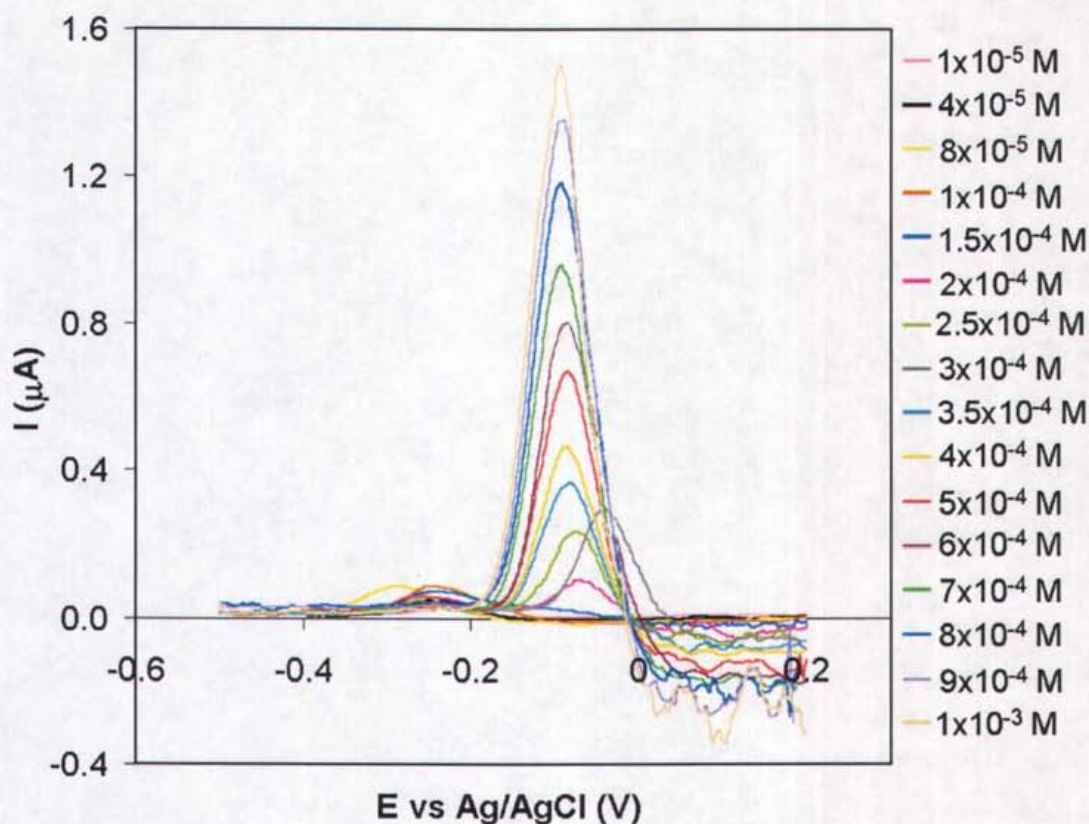


Figura 59. Perfil polarográfico de la curva de calibración del GSH por polarografía diferencial de pulsos. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones 6.3 a 6.7. EGM. PI=-0.5 V; PF=0.2 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; AP=0.05 V; DP=0.05 s.

En la Figura 60 se aprecian sólo las curvas polarográficas para las concentraciones de GSH donde se puede apreciar mejor la presencia de las señales debidas a la adsorción comentada anteriormente y a la difusión del analito de interés. El efecto notable de la

adsorción que se ha mencionado se puede explicar al recordar que, en esta técnica, la perturbación de potencial consiste en una secuencia de pulsos y una escalera de potencial. Con ello, tanto el potencial base como el potencial aplicado van aumentando paulatinamente, lo que conduce que el sistema jamás regrese a las condiciones iniciales, y por lo tanto, no llega a un valor de potencial donde no ocurre reacción electroquímica. Además de que el electrodo presenta una saturación en cuanto a la cantidad adsorbida del analito, pues a la concentración de 2×10^{-4} M se tiene la máxima señal para el pico de adsorción y una vez que la concentración aumenta ya no hay un aumento de esta señal, sino ahora comienza a incrementar la señal debida al proceso de difusión (Figura 60).

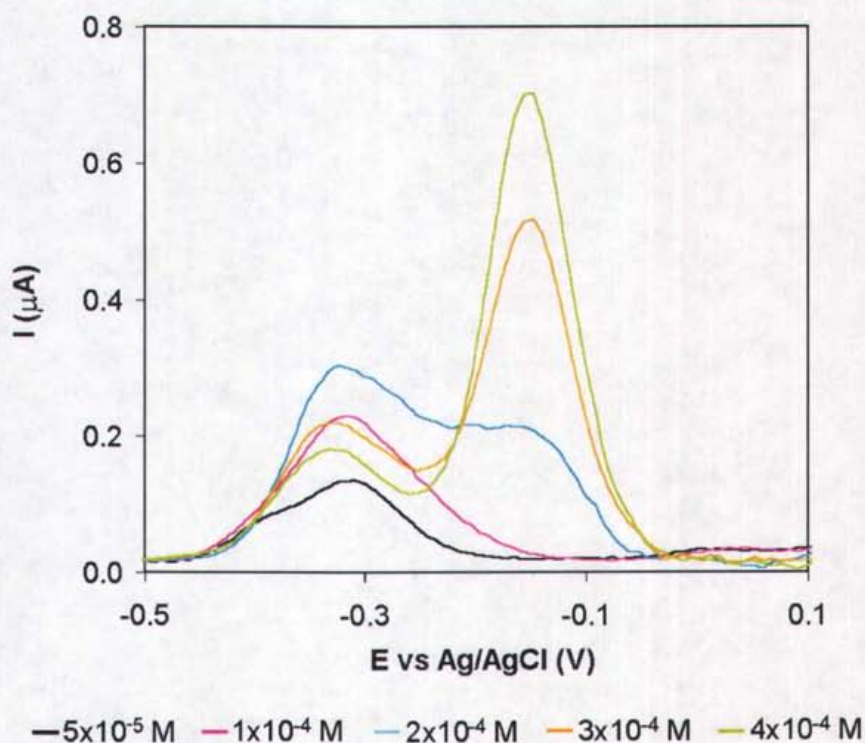


Figura 60. Señales obtenidas en polarografía diferencial de pulsos para distintas concentraciones de GSH. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final 6.7. DME. $\text{PI} = -0.5$ V; $\text{PF} = 0.1$ V; $\text{IB} = 4$ mV; $\text{TG} = 0.8$ s; $\text{AP} = 0.05$ V; $\text{DP} = 0.05$ s.

En la Figura 61 se aprecia la curva de calibración de GSH; dicha curva no presenta linealidad en todo el intervalo de concentraciones mostrado, sino que existen dos zonas que presentan linealidad por separado; la primera está en el intervalo de 1 a 8×10^{-5} M y la segunda abarca el intervalo de 2×10^{-4} a 1×10^{-3} M. De acuerdo a esto, podría haber dos intervalos de concentraciones de GSH donde ésta técnica podría aplicarse satisfactoriamente para realizar la cuantificación del analito: (a) para concentraciones de GSH menores a 8×10^{-5} M y (b) para concentraciones por arriba de 2×10^{-4} M. Por otro lado, ya que la concentración de GSH que se desea detectar en los homogenizados de cerebro de rata preparados de acuerdo a la metodología experimental oscila entre 1 y 2×10^{-4} M, se procedió a modificar la duración del pulso (DP) con el fin de aumentar el tamaño de la señal de difusión. Sin embargo, no se logró mejorar la intensidad del pico de interés.

De acuerdo a lo anterior, se decidió no emplear la técnica de polarografía diferencial de pulsos para llevar a cabo la cuantificación del GSH, dado que es extremadamente sensible a la adsorción del producto de oxidación del glutatión y esto no permite obtener una curva de calibración con un intervalo lineal continuo. Sin embargo es una técnica adecuada si se desea cuantificar el glutatión en el intervalo de concentración de 1 a 8×10^{-5} M.

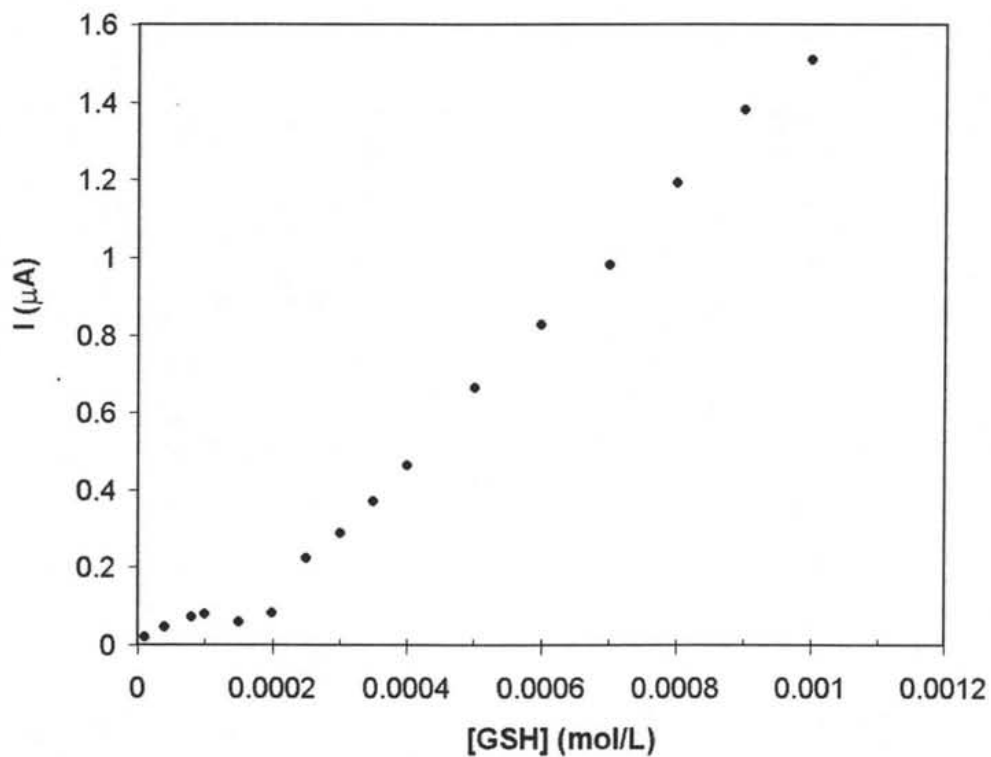


Figura 61. Curva de calibración del GSH por polarografía diferencial de pulsos. Mezcla 1:1 de amortiguador Dulbecco y HPO_3 al 10%, neutralizada con NaOH. pH final de las soluciones 6.3 a 6.7. EMG. PI=-0.5 V; PF=0.2 V; IB=4 mV; TG=0.8 s; AP=0.05 V; DP=0.05 s.