



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE
QUÍMICA

Caracterización Electroquímica de complejos de inclusión de ácidos
protocatecuico, cafeico y clorogénico con alfa y beta ciclodextrinas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

Salvador Guadalupe Hernández Vargas.



México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Martha Aguilar Martínez.

VOCAL: Profesor: Q. Ana Isabel Carranco Pérez.

SECRETARIO: Profesor: Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba.

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Francisco Javier Garfías Vásquez.

2° SUPLENTE: Profesor: I.Q. Miguel Ángel Vargas Hernández.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA MOLECULAR. LABORATORIO 4-F.
EDIFICIO A. FACULTAD DE QUÍMICA. U.N.A.M.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. NORMA ANGÉLICA MACÍAS RUVALCABA.

FIRMA

Sustentante:

Salvador Guadalupe Hernández Vargas.

FIRMA

Algunos de los resultados experimentales de este trabajo de Tesis, se presentaron en el siguiente Congreso Nacional:

XXIV Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica.
Second Meeting of the Mexican Electrochemical Society.

En la presentación oral:

Caracterización Electroquímica de Complejos de Inclusión de Compuestos *o*-difenólicos Naturales con Ciclodextrinas y su Posible Aplicación a la Conservación de Alimentos.

Puerto Vallarta, Jalisco. 31 de mayo-5 de junio de 2009.

Agradecimientos

A la Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba, por confiar en mí y por enseñarme lo duro y a la vez lo hermoso de la investigación. Gracias por ser más que una asesora, una amiga con la que sé que puedo contar en cualquier situación.

A la Dra. Martha Aguilar, por sus consejos tanto personales como académicos y su grata compañía durante mi estancia en el laboratorio 4-F.

A la Q. Ana Isabel Carranco por todas las facilidades que me otorgó al revisar este trabajo.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la U.N.A.M en especial al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo y la beca que recibí en todo el período que se desarrollo el proyecto (Clave: IN-203208).

A mi querida madre Flor por ser la luz que me acompañó a lo largo de este trayecto, y por ser la persona a quien yo le debo todo, le agradezco todo el gran amor, dedicación y fuerza que me ha brindado toda la vida, por que no tengo palabras para agradecerle todas las cosas que me ha dado.

A mi padre Salvador en donde quiera que se encuentre, pues se que él se encontraría feliz y orgulloso de haberme podido acompañar en este momento. Descanse en paz.

A mis hermanas Myriam y Paty por apoyarme en mis horas difíciles y por demostrarme que no hay un problema lo suficientemente grande, que en familia no pueda solucionarse.

A mis sobrinos Mary y Salvador Edmundo por confiar en mí cuando han tenido problemas y por brindarme muchos momentos de felicidad. Los quiero mucho y les dedico con especial cariño este trabajo.

A Miriam Leonardo por demostrarme que en la vida siempre se puede obtener algo más de lo que se tiene, por enseñarme que todo depende del cristal donde se mire y por ser mi inspiración y mi mejor amiga a lo largo de este periodo de mi vida.

A mis eternos amigos: Hugo Ángel Pardiñas, Juan Carlos Velásquez, Moisés Cabrera y Juan Carlos Pardiñas, quienes han sido como mis hermanos desde que los conocí en la secundaria.

A Marlene Bedolla por todas las lecciones de la vida que hemos aprendido juntos gracias a nuestra gran amistad y a Margarita Cantú y Dianita Sánchez quienes siempre han estado para apoyarme y comprenderme en mis momentos grises y en los momentos de dicha.

También esta dedicatoria es para Laura Peláez, Rosario Cuevas y Jonathan Moreno que siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas.

A todos los amigos que he hecho a lo largo de la facultad y la preparatoria y que siguen conmigo de alguna u otra forma : Celso Palomar, Israel Pérez Moreno, Nydia Mejía, Paola Cortés, Erika Camacho, Roxana Hermes, Jorge Guillermo Sánchez de los Monteros, Gerardo Yañez y su novia Laura Edith, Verónica Legorreta, Genaro Santillán, Fernando Mota, Marisol Rosas, Eduardo Gutiérrez, Valeria Saavedra, Pedro y su novia Carmen Ileana y Carlos Mora Brito, por siempre apoyarme, escucharme y aconsejarme cada vez que me equivocó.

Al nuevo elenco del laboratorio 4-F: Elisa, Elizabeth, Maribel, Paloma, Areli y Yésica.

YOUNG BOY.

Paul McCartney.

Flaming Pie (1997).

He's just a young boy lookin' for a way to find love.
It isn't easy, nothing you can say will help him find love.
He's gotta do it for himself and it can take so long,
He's just a young boy lookin' for a way to find love.

He doesn't need another helping hand from someone,
But don't you think he doesn't understand what he wants someone?
Though independence means a lot, he's gotta still be strong,
He's just a young boy lookin' for a way to find love.

Find love, a perfect combination,
Find love, whatever you do.
Find love, a cause for celebration,
Then it might come lookin', (lookin') come lookin' for you.

Find love, in any situation,
Find love, whatever you do.
Find love, a cause for celebration,
Then it might come lookin', (lookin') come lookin'g for you.

He's just a young boy lookin' for a way to find love.
It isn't easy, nothing you can say will help him find love.
He's gotta do it for himself and it can take so long,
He's just a young boy lookin' for a way to find love, yeah.

Find love, a time for meditation,
Find love, a source of inspiration,
Find love, instead of confrontation.
Find love and love will come lookin' for you-oo.

Índice.

Lista de Tablas y Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas y Símbolos	xvii
Capítulo 1.	
Introducción.....	1
Capítulo 2.	
Hipótesis y Objetivos.	
Hipótesis.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
Capítulo 3.	
Antecedentes.	
3.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.....	4
3.1.1 Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$).....	5
3.1.2 Anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).....	6
3.1.3 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	7
3.1.4 Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).....	8
3.1.5 Óxido nítrico (NO^{\cdot}).....	8
3.2 Daño provocado por las EROS.....	9
3.3 Oxidación de los lípidos.....	10
3.3.1 Autooxidación de los lípidos.....	10
3.3.2 Fotooxidación de los lípidos.....	13
3.3.3 Oxidación por lipooxigenasa.....	14
3.4 Conceptos básicos de los antioxidantes.....	15
3.4.1 Tipos y mecanismos de antioxidantes.....	16
3.4.1.1 Antioxidantes primarios.....	16
3.4.1.2 Compuestos sinergistas.....	17
3.4.1.3 Antioxidantes secundarios.....	18
3.4.2 Antioxidantes naturales vs. Antioxidantes sintéticos.....	19

3.5 Principales antioxidantes naturales presentes en frutas, verduras y semillas.....	20
3.5.1 Los tocoferoles.....	20
3.5.2 Compuestos derivados de los flavonoides.....	22
3.5.3 Derivados <i>o</i> -difenólicos de los ácidos benzoico y cinámicos.....	23
3.6 Oscurecimiento en productos alimenticios.....	26
3.6.1 Oscurecimiento enzimático.....	26
3.7 Métodos empleados contra el oscurecimiento enzimático.....	29
3.7.1 Métodos de protección físicos.....	29
3.7.2 Protección contra el oxígeno.....	30
3.7.3 Métodos químicos.....	30
3.7.3.1 Compuestos reductores.....	31
3.7.3.2 Agentes quelantes.....	31
3.7.3.3 Agentes acidulantes.....	31
3.7.3.4 Compuestos inhibidores de las PPO.....	32
3.7.3.5 Tratamientos enzimáticos.....	32
3.7.3.6 Formación de complejos con los sustratos de la PPO.....	33
3.8 Aspectos generales de las ciclodextrinas.....	33
3.9 Formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y moléculas orgánicas.....	35

Capítulo 4.

Parte Experimental

4.1	
Reactivos.....	37
4.2 Equipo y materiales empleados.....	38
4.3 Procedimiento.....	41
4.3.1 Calibración del área efectiva del electrodo de trabajo y determinación de la resistencia no compensada, R_u	41
4.3.2 Electrólisis a potencial controlado para los compuestos <i>o</i> -difenólicos.....	42

4.3.3 Determinación del comportamiento electroquímico de los compuestos <i>o</i> -difenólicos en ausencia de CD.....	42
4.3.4 Determinación del comportamiento electroquímico de los compuestos <i>o</i> -difenólicos en presencia de CD.....	43
Capítulo 5.	
Resultados y discusión.....	45
5.1 Calibración del área efectiva del electrodo de trabajo y determinación de la resistencia no compensada.....	45
5.2 Estudio electroquímico de los compuestos <i>o</i> -difenólicos en medio acuoso.....	52
5.2.1 Voltamperometría cíclica.....	52
5.2.2 Electrólisis a potencial controlado.....	56
5.2.3 Investigación del mecanismo de oxidación mediante simulación digital.....	58
5.3 Caracterización del fenómeno de inclusión entre α - y β -ciclodextrinas y los compuestos <i>o</i> -difenólicos.....	69
5.3.1 Estudio por voltamperometría cíclica.....	69
5.3.2 Determinación de las constantes de formación, K_f , mediante el modelo de Evans y colaboradores.....	73
5.3.3 Resultados obtenidos por otros autores que sirven de apoyo a nuestros resultados.....	76
5.3.3.1 Estequiometría, fuerzas estabilizadoras y orientación de las moléculas de ACGN y ACAF en el complejo con β -CD.....	76
5.3.3.2 Valores de las constantes de formación para los compuestos <i>o</i> -difenólicos encontrados en la literatura y comparación con nuestros resultados.....	80
Capítulo 6.	
Conclusiones.....	82

Capítulo 7.

Referencias.....	84
-------------------------	-----------

Anexo A.

Fundamentos de Electroquímica y Cinética Electroquímica.....	89
---	-----------

Anexo B.**Fundamento de las técnicas y mecanismos de reacción.**

B.1 Voltamperometría cíclica.....	104
B.1.1 Teoría y fundamentos de la técnica.....	104
B.1.2 Consideraciones prácticas: Corriente capacitiva y caída óhmica.....	112
B.1.3 Mecanismos electroquímicos.....	115
B.1.3.1 Mecanismo EC.....	115
B.1.3.2 Mecanismo ECE.....	119
B.2 Electrólisis a potencial controlado.....	121

Lista de Tablas y Figuras.
Tablas.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.....	5
Tabla 2. Constantes de rapidez el ácido cafeico y el ácido clorogénico con diversas EROS.....	25
Tabla 3. Principales propiedades físicas de las CD.....	35
Tabla 4. Potenciales anódicos y catódicos de los compuestos <i>o</i> -difenílicos en medio acuoso de KCl 1.0 M obtenidos a 0.1 V/s.....	54
Tabla 5. Masas y volúmenes moleculares de los compuestos <i>o</i> -difenílicos calculados mediante la optimización de la geometría molecular con la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a nivel B3LYP 6-31G*.....	55
Tabla 6. Número de electrones obtenidos en electrólisis a potencial controlado para los compuestos <i>o</i> -difenílicos.....	58
Tabla 7. Valores de pKa de los compuestos <i>o</i> -difenílicos.....	60
Tabla 8. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl. Simulación basada en un mecanismo EC, de acuerdo con 8a) el modelo de Butler-Volmer y 8b) el modelo de Marcus.....	61
Tabla 9. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 M. Simulación basada en un mecanismo EEC, usando el modelo de Butler-Volmer.....	64
Tabla 10. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 M. Simulación basada en un mecanismo ECE usando el modelo cinético de Butler-Volmer.....	65

Tabla 11. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 M. Simulación basada en un mecanismo ECEC, con el modelo cinético de Butler-Volmer.....	66
Tabla 12. Constantes de formación para los complejos de inclusión de los compuestos <i>o</i> -difenólicos con α - y β -CD.....	75
Tabla 13. Comparación entre los valores de las constantes de formación (K_f) para los complejos de inclusión de los compuestos <i>o</i> -difenólicos con α - y β -CD, obtenidos por otras técnicas.....	80
Figuras:	
Figura 1. Diagrama de orbitales moleculares de la molécula de oxígeno en su estado basal de triplete 3O_2	6
Figura 2. Procesos enzimáticos de formación y degradación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la célula.....	7
Figura 3. Producción de peroxinitrito y sus EROS derivadas.....	9
Figura 4. Diversos productos de descomposición de los peróxidos lipídicos.....	12
Figura 5. Gráfica hipotética del factor de oxidación de un producto alimenticio.....	13
Figura 6. Mecanismo de oxidación de ácidos grasos por la lipooxigenasa.....	14
Figura 7. Principales compuestos sinergistas.....	18
Figura 8. Diferencias estructurales entre los diversos homólogos de los tocoferoles.....	21
Figura 9. Estructuras de compuestos relacionados a los flavonoides.....	23
Figura 10. Diversos compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico.....	24
Figura 11. Reacciones de oxidación de sustratos fenólicos por la PPO.....	27
Figura 12. Acción de la lacasa sobre distintos sustratos fenólicos...	27
Figura 13. Estructura de las PPO.....	28

Figura 14. Reacciones de <i>o</i> -quinonas con diversos compuestos que llevan a la formación de melaninas y compuestos coloridos que provocan el oscurecimiento enzimático.....	29
Figura 15. Estructura en forma de cono truncado de las CD, en este caso se representa la β -CD.....	34
Figura 16. Estructura química, nombre y clave de los compuestos <i>o</i> -difenílicos estudiados.....	37
Figura 17. Esquema de la celda empleada para los experimentos de voltamperometría cíclica.....	38
Figura 18. Especificaciones de los electrodos de trabajo y referencia que se emplearon en este trabajo.....	39
Figura 19. Diagrama de la celda empleada para los experimentos de electrólisis a potencial constante.....	40
Figura 20. Voltamperogramas cíclicos de FCM 0.55 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	47
Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de FCM 0.55, 1.07, y 1.63 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidad de barrido de 0.1 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	47
Figura 22. Comparación entre los voltamperogramas teóricos (símbolos) y experimentales (línea continua) de FCM 1.63 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido: a) 0.1V/s b) 5.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	50
Figura 23. Comparación entre los voltamperogramas teóricos (símbolos) y experimentales (línea continua) de FCM: a) 0.5 mM y b) 1.0 mM en KCl 1 M a 25 °C a una velocidad de barrido de 0.1V/s . Electrodo de trabajo: C vítreo.....	51
Figura 24. Voltamperogramas cíclicos de APTC 1.09 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	52
Figura 25. Voltamperogramas cíclicos de ACAF 1.15 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	53

Figura 26. Voltamperogramas cíclicos de ACGN 1.99 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3 y 5 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	53
Figura 27. Estabilización a través de puente de hidrógeno intramolecular en el radical semiquinona de compuestos <i>o</i> -difenílicos.....	55
Figura 28. Voltamperogramas con corriente normalizada a la concentración para: APTC, ACAF y ACGN en KCl 1 M a 25 °C y 0.1V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.....	56
Figura 29. Curva carga vs. tiempo para la electrólisis a potencial controlado de 0.7 V vs. Ag/AgCl para: APTC, ACAF y ACGN en KCl 1.0 M a temperatura ambiente.....	57
Figura 30. Reactividad de las <i>o</i> -quinonas electrogeneradas en presencia de nucleófilos, vía la reacción de adición de Michael.....	58
Figura 31. Esquema cuadrado mostrando las diferentes trayectorias posibles del proceso de oxidación de <i>o</i> -hidroquinona a <i>o</i> -benzoquinona.....	59
Figura 32. Voltamperogramas cíclicos experimentales de APTC 1.09 mM, en disolución acuosa conteniendo KCl 1.0 M a 25 °C y velocidad de barrido de 0.2 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo. Simulaciones basadas en un mecanismo EC, de acuerdo con el modelo cinético de transferencia de electrones de: a) Butler-Volmer y b) Marcus de acuerdo a los parámetros descritos en las Tablas 9a y 9b, respectivamente.....	62
Figura 33. Voltamperogramas cíclicos experimentales (línea continua) de APTC 1.09 mM, en disolución acuosa conteniendo KCl 1.0 M a 25 °C a una velocidad de barrido de 3.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo. Simulación de acuerdo a un mecanismo EEC, parámetros de simulación en la Tabla 9.....	64

Figura 34. Voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa conteniendo KCl 1.0 M a 25 °C a diferentes velocidades de barrido: a) 0.05 V/s, b) 0.3 V/s, c) 1.0 V/s, d) 3.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo. Simulación de acuerdo al mecanismo ECEC, con los parámetros de simulación mostrados en la Tabla 11.....	67-68
Figura 35. Voltamperogramas cíclicos de APTC: a) 1.07 mM b) 1.26 mM en KCl 1.0 M a 25°C y 0.1 V/s, en presencia de concentraciones crecientes de: a) α -CD y β -CD.....	70
Figura 36. Voltamperogramas cíclicos de ACAF: a) 0.73 mM b) 0.69 mM en KCl 1.0 M a 25°C y 0.1 V/s, en presencia de concentraciones crecientes de α - y β -CD.....	71
Figura 37. Voltamperogramas cíclicos de ACGN a) 1.01 mM b) 1.04 mM en KCl 1.0 M a 25°C y 0.1 V/s, en presencia de concentraciones crecientes de α - y β -CD.....	72
Figura 38. Determinación gráfica de la constante de formación del complejo de inclusión entre ACAF y α - y β -CD's.....	75
Figura 39. Estructuras de las dos posibles orientaciones del ACAF al formar el complejo de inclusión con β -CD.....	78
Figura 40. Estructuras de las dos posibles orientaciones del ACGN al formar el complejo de inclusión con β -CD.....	79
Figura 41. Modelo propuesto para la región de la doble capa bajo condiciones donde los aniones se encuentran específicamente adsorbidos.....	90
Figura 42. Esquema representativo de: a) reducción, b) oxidación de la especie hipotética A, dicho proceso redox, se lleva a cabo mediante la variación del potencial (E) del electrodo con respecto a la disolución, lo que provoca que la transferencia se lleve hacia un lado o hacia el otro.....	91
Figura 43. Representación esquemática del efecto del potencial del electrodo en la energía libre (ΔG) versus las curvas de coordenadas de reacción, para un sistema monoelectrónico a dos potenciales.....	98

Figura 44. Efecto de los dipolos del disolvente, sobre reactivos y productos durante una reacción de transferencia electrónica, en un intercambio isotópico.....	101
Figura 45. Arreglo de tres electrodos de los equipos electroquímicos modernos.....	104
Figura 46. Representación gráfica de la variación del potencial en los experimentos de voltamperometría cíclica.....	106
Figura 47. Voltamperograma cíclico de $K_3[Fe(CN)_6]$ 6 mM en 1M de KNO_3	107
Figura 48. Perfiles de concentración para FICN y FOCN, durante el experimento de voltamperometría cíclica.....	109
Figura 49. Voltamperograma de barrido lineal en términos de la función de corriente adimensional, que ilustra la relación existente entre los diversos parámetros para un sistema reversible.....	111
Figura 50. Representación de una celda electroquímica como un circuito eléctrico.....	112
Figura 51. Respuesta de la corriente de capacitancia para un barrido cíclico de potencial, asumiendo una capacitancia constante.....	114
Figura 52. Voltamperogramas cíclicos obtenidos por simulación para un mecanismo EC.....	118
Figura 53. Simulaciones de voltamperogramas obtenidos por simulación para un mecanismo ECE.....	120
Figura 54. Esquema de reacciones ejemplificando un mecanismo de reacción ECE.....	121
Figura 55. Comportamiento de la corriente en un experimento de electrólisis a potencial controlado.....	124

Lista de Abreviaturas y Símbolos.

a	Aceleración
A	Área del electrodo de trabajo.
ACAF	Ácido cafeico
ACGN	Ácido clorogénico
ADHA	Ácido deshidroascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APTC	Ácido protocatecuico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
C*	Concentración en el seno de la disolución.
C_O^*	Concentración en el seno de la disolución para el oxidante.
C_R^*	Concentración en el seno de la disolución para el reductor.
CD	Ciclodextrinas.
CE	Contraelectrodo. (electrodo auxiliar)
C_{dl}	Capacitancia de la doble capa.
D	Coefficiente de difusión.
D_{app}	Coefficiente de difusión aparente
D_c	Coefficiente de difusión del complejo
D_f	Coefficiente de difusión de la molécula huésped en estado libre.
D_O	Coefficiente de difusión de la especie oxidante.
D_R	Coefficiente de difusión de la especie reductora.
E	Potencial.
E°	Potencial formal.
$E_{1/2}$	Potencial de media onda.
E_{appl}	Potencial aplicado.
E_e	Potencial de equilibrio.
E_i	Potencial inicial.
$E_{p/2}$	Potencial a la mitad del pico.
E_{pa}	Potencial de pico anódico.
E_{pc}	Potencial de pico catódico.
E_λ	Potencial de inversión.
ECS	Electrodo de calomel saturado.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.

EROS	Especies Reactivas de Oxígeno.
f	Coeficiente de fricción
F	Constante de Faraday.
FCM	Ferrocenometanol.
$F_{fr,x}$	Fuerza Friccional
FICN	Ferricianuro de Potasio (Hexacianoferrato(III) de Potasio).
FOCN	Ferrocianuro de Potasio (Hexacianoferrato(II) de Potasio).
$F_{total,x}$	Fuerza total en la dirección x
$F_x(t)$	Fuerza en función del tiempo
GPx	Glutación peroxidasa
h	Constante de Planck.
HAsc	Ácido ascórbico.
HOMO	Orbital molecular más alto ocupado. (Highest Occupied Molecular Orbital).
i	Corriente.
i_0	Corriente de intercambio.
i_a	Corriente anódica.
i_c	Corriente catódica.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la actividad enzimática.
i_{cap}	Corriente capacitiva.
IHP	Plano interno de Helmholtz. (Inner Helmholtz Plane).
i_N	Corriente normalizada a la concentración.
$i_{p,o}$	Corriente de pico en ausencia de ciclodextrinas.
i_{pa}	Corriente de pico anódica
i_{pc}	Corriente de pico catódica.
i^*	Función de corriente adimensional
J	Flujo.
k	Constante cinética de velocidad.
k°	Constante heterogénea de transferencia de electrones.
k_b	Constante cinética de rapidez para el proceso inverso.
k_B	Constante de Boltzmann.
k_f	Constante cinética de velocidad para el proceso directo.
K_d	Constante de equilibrio de disociación.

K_f	Constante de equilibrio de formación.
K_i	Constante de equilibrio i-ésima.
K_{Mapp}	Constante de Michaelis aparente
LDL	Lipoproteínas de baja densidad. (Low Density Lipoproteins).
m	Masa.
m_0	Coefficiente de transporte de masa.
n	Número de electrones.
N_0	Número de moles electrolizados.
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato.
OHP	Plano externo de Helmholtz. (Outer Helmholtz Plane).
PI	Periodo de inducción.
PPO	Enzima Polifenoloxidasa
Prx	Peroxiredoxinas.
Q	Carga.
Q_{ads}	Carga debido a la adsorción.
Q_C	Carga capacitiva.
q_j	j-ésima coordenada de vibración normal.
R	Resistencia eléctrica.
R	Distancia de los reactantes.
RE	Electrodo de referencia.
R_u	Resistencia no compensada, Resistencia de la disolución.
S	Parámetro de Sinergismo.
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida.
SOD	Superóxido dismutasa.
t	Tiempo.
T	Temperatura.
TOH	Tocoferoles
v	Velocidad de una reacción química
v_b	Velocidad de la reacción inversa.
VC	Voltamperometría cíclica.
v_f	Velocidad de la reacción directa.
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
WE	Electrodo de trabajo (Working Electrode).

x	Fracción del coeficiente de difusión.
x	Fracción de concentración de la especie oxidada.
\hat{x}	Desplazamiento promedio.
Z	Unidad de carga para iones.
Z	Factor de Probabilidad cinético.
α	Coefficiente de transferencia electrónica.
α -CD	α -Ciclodextrina.
β -CD	β -Ciclodextrina
γ -CD	γ -Ciclodextrina
Γ	Cantidad de analito adsorbido en moles.
ΔE_p	Diferencia de Potenciales de pico.
ΔG	Energía libre de Gibbs.
ΔG_b^\ddagger	Energía libre de Gibbs del estado de transmisión para el proceso inverso.
ΔG_f^\ddagger	Energía libre de Gibbs del estado de transición para el proceso directo.
ϵ_{OP}	Coefficiente dieléctrico óptico.
ϵ_s	Coefficiente dieléctrico estático.
η	Sobrepotencial.
η^*	Viscosidad
λ	Energía libre de reorganización.
λ^*	Tiempo de inversión de potencial en voltamperometría cíclica
λ_0	Energía libre de reorganización debida a solvatación.
λ_i	Energía libre de reorganización vibracional.
v	Velocidad de barrido de potencial.
v^*	Velocidad de convección
ω	Trabajo electroestático.
%S	Porcentaje de Sinergismo

Capítulo 1.**Introducción.**

El oscurecimiento enzimático es un serio problema que se presenta en las frutas y verduras, este proceso comienza con la oxidación de diversos sustratos fenólicos, principalmente *o*-difenoles, que se encuentran en dichos alimentos. La reacción de oxidación es catalizada a través de la polifenol oxidasa (PPO), que interviene para formar productos de tipo quinona, los cuales pueden sufrir diversas reacciones y así formar agregados moleculares de alto peso molecular llamados melaninas, que son los causantes del oscurecimiento observado. Mantener bajo control dichos procesos es de vital importancia y es por ello que se ha implementado el uso de diversos aditivos que ayuden a la eliminación de estos procesos indeseables. Una de las clases de compuestos que apunta a ser una excelente opción para satisfacer estas demandas son las ciclodextrinas (CD), que son oligómeros de unidades de carbohidratos agrupadas *n* veces para formar una estructura cíclica. Las ciclodextrinas poseen cualidades anfipáticas sorprendentes, debido a su alta solubilidad en agua y su capacidad para formar complejos de inclusión con compuestos apolares.

La observación previa de que la adición de CD previene el oscurecimiento enzimático en preparados de manzana fresca ha sugerido que los compuestos *o*-difenoólicos, que son los sustratos de la PPO, son capaces de formar complejos de inclusión con las CD's, por lo que al estar el sustrato en el interior de la cavidad de la CD, la PPO no es capaz de oxidarlo. Basados en esto, consideramos que la formación de complejos de inclusión estables hará a los compuestos *o*-difenoólicos menos susceptibles a la oxidación enzimática por PPO, evitando y/o retardando el oscurecimiento enzimático de los alimentos. Por tal motivo, el objetivo primordial de este trabajo fue el de caracterizar el proceso de inclusión entre las α - y β - ciclodextrinas y algunos de los compuesto *o*-difenoólicos más abundantes en frutas y verduras: el ácido protocatecuico (APTC), el ácido cafeico (ACAF) y el ácido clorogénico (ACGN).

El estudio voltamperométrico de los tres compuestos *o*-difenoólicos realizado inicialmente en ausencia de CD, muestra la presencia de un pico anódico (i_a) asociado a un pico catódico (i_c), este mismo comportamiento se observó a todas las velocidades de barrido estudiadas de 0.1 a 10 V/s, lo que muestra que en la escala de tiempo del

experimento, el producto de oxidación es estable. En el pico anódico (i_a) ocurre la oxidación del compuesto *o*-difenólico a la correspondiente *o*-benzoquinona, en tanto que en el pico catódico ocurre el proceso de reducción. El análisis de los voltamperogramas cíclicos experimentales, mediante simulación digital muestra que la oxidación de estos compuestos ocurre vía un mecanismo ECEC.

En presencia de concentraciones crecientes de α - y β -CD, los voltamperogramas de los tres compuestos estudiados presentan un desplazamiento positivo en el potencial de pico anódico (E_{pa}) y un desplazamiento negativo en el potencial de pico catódico (E_{pc}), así como también una disminución en el valor de la corriente de los picos i_a e i_c respectivamente. Este comportamiento indica dos cosas, la primera, que en presencia de CD es necesario invertir más energía para lograr la oxidación, y la segunda es la evidencia de la formación de los complejos de inclusión, que se demuestra por el decremento de las corrientes anódica y catódica, que reflejan la disminución del coeficiente de difusión del compuesto *o*-difenólico debido a la formación del complejo.

La determinación de las constantes de formación (K_f) de los complejos de inclusión, se realizó mediante la variación de la corriente del pico anódico en función de la concentración de CD, utilizando el modelo matemático desarrollado por Evans y *col.* Para todos los complejos de inclusión estudiados se obtuvo un buen ajuste lineal de los resultados experimentales a dicho modelo, para concentraciones de CD superiores a la concentración estequiométrica de ácido *o*-difenólico. Los resultados muestran que para los tres compuestos estudiados las constantes de formación del complejo de inclusión con ambas CD's se encuentran en el mismo orden de magnitud. Los valores de K_f indican que la inclusión del compuesto *o*-difenólico en la cavidad de la ciclodextrina es un proceso favorable, con una estequiometría 1:1. En cuanto a tendencias estructurales, las constantes de formación indican que los derivados del ácido cinámico se asocian preferentemente con la α -CD, mientras que los derivados del ácido benzoico lo hacen con la β -CD.

Capítulo 2.**Hipótesis y Objetivos.****Hipótesis**

- Si los compuestos *o*-difenólicos se incluyen en la cavidad de la ciclodextrina formando complejos de inclusión estables, entonces la enzima PPO no los podrá reconocer como sus sustratos, lo que evitará o retardará el proceso de oscurecimiento enzimático.

Objetivo General

- Caracterizar el proceso de formación de complejos de inclusión, entre α - y β -CD y diversos compuestos *o*-difenólicos naturales en medio acuoso, mediante la técnica de voltamperometría cíclica (VC).

Objetivos Específicos

- Estudiar el comportamiento electroquímico por VC y electrólisis a potencial controlado (CC) de los compuestos *o*-difenólicos en medio acuoso de KCl 1 M e investigar el mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación a la correspondiente *o*-quinona.
- Caracterizar el comportamiento voltamperométrico de los compuestos *o*-difenólicos en presencia de CD y utilizando el modelo de Evans y *col.* evaluar las constantes de equilibrio asociadas a la formación de complejos de inclusión entre los compuestos *o*-difenólicos y las CD.

Capítulo 3.

Antecedentes:

3.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.

La manifestación de una enfermedad en el ser humano dista de ser un proceso unifactorial, ya que la mayoría de las veces se debe a un conjunto de causas de toda índole, como son una alimentación inadecuada, estados depresivos, falta de ejercicio y a otros factores como la raza, el sexo y la edad del individuo. Si bien, el organismo ha desarrollado una gran cantidad de ingeniosos mecanismos para mantener el equilibrio con el medio ambiente, hay muchas ocasiones en las que el desequilibrio supera en todo margen a estos mecanismos reguladores, lo que se traduce en la aparición de varios desórdenes entre los que se encuentra el estrés oxidativo. En las últimas décadas, el estrés oxidativo ha tomado un lugar de importancia en los trabajos de investigación a nivel mundial^[1] por la gran cantidad de problemas de salud^[2-6] tales como cáncer, arteriosclerosis, infertilidad^[7], problemas de tipo cardiaco, isquemia y envejecimiento que se asocian al exceso en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) las cuales empeoran significativamente el daño a pacientes que sufren de enfermedades como: diabetes, VIH-SIDA y leucemia. Aunque debe tenerse claro que las EROS no son en sí del todo perjudiciales, ya que en pequeñas concentraciones desempeñan diversas funciones en el organismo como la señalización intracelular y la regulación redox.

Algo que es importante destacar es que englobadas dentro del concepto de EROS, no sólo se encuentran la especies radicales y no radicales que se producen por la reducción del oxígeno molecular^[2,8] sino que también otras especies derivadas del nitrógeno o incluso especies de cloro^[9] como puede observarse en la Tabla 1.

A pesar de que la variedad de EROS producidas en el organismo es extensa, solamente algunas de estas especies se encuentran en cantidades apreciables para generar daños significativos. Entre las EROS más abundantes y nocivas^[2,4, 8-10] desde un punto de vista biológico se encuentran el oxígeno singulete, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.

Radicales	No radicales
Superóxido $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno H_2O_2
Hidroxilo OH^{\cdot}	Ácido hipobromoso $HO-Br$
Hidroperóxido $HO-O^{\cdot}$	Oxígeno singulete 1O_2
Peroxilo lipídico $R-O-O^{\cdot}$	Ácido hipocloroso $HO-Cl$
Alcoxilo lipídico	Cloruro de nitronio NO_2Cl
Cloruro atómico Cl^{\cdot}	Cloraminas
Óxido nítrico NO^{\cdot}	Ácido nitroso HNO_2
Dióxido de nitrógeno NO_2^{\cdot}	Catión nitrosilo NO^+
	Tetraóxido de dinitrógeno N_2O_4
	Peroxinitrito $NO-O^{\cdot}$

3.1.1 Oxígeno singulete (1O_2).

El oxígeno molecular tal y como lo encontramos en la naturaleza se encuentra en su estado basal de triplete (3O_2), esto es con dos electrones desapareados^[11,12] en los orbitales $2p\pi_g$ (Figura 1). Por ende el oxígeno molecular por razones energéticas tiende a estar siempre en la configuración de la Figura 1 a menos que la influencia de un factor externo como puede ser la incidencia de radiación en presencia de un agente sensibilizante, como las flavinas, promueva el apareamiento de los electrones en el orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO), ya sea en el mismo (singulete Δ) o en orbitales distintos (singulete Σ). La generación de esta especie causa severos daños en los sistemas lipídicos tanto de los alimentos como del organismo que los ingiere, ya que es cerca de 1,000 veces más reactiva que el oxígeno triplete, sin embargo se verán los detalles de este mecanismo fotoinducido en las secciones posteriores, donde se tratará la peroxidación lipídica.

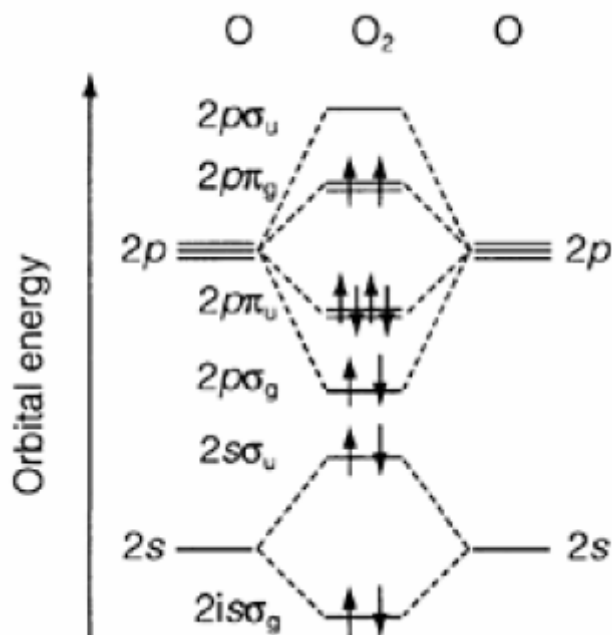


Figura 1. Diagrama de orbitales moleculares de la molécula de oxígeno en su estado basal de triplete $^3\text{O}_2$.

3.1.2 Anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

Esta especie se produce en el organismo por diversos sistemas enzimáticos como son NADPH oxidasa, xantina oxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa o por vía no enzimática por la autooxidación de varios componentes presentes en los alimentos, como flavonoides, compuestos fenólicos, algunas fragancias y colorantes. También por la exposición fotoquímica de los alimentos y por la adición de un electrón extra al oxígeno intracelular, lo que generalmente se lleva a cabo durante la cadena respiratoria. Si bien este radical no es muy reactivo debido a que no puede atravesar las membranas celulares, el radical superóxido puede reaccionar de distintas maneras, incluyendo la reacción con NO^{\cdot} para producir peroxinitrito y las reacciones con las enzimas que poseen centros de hierro-azufre como la aconitasa en mamíferos. Adicionalmente, el radical superóxido puede dismutar de acuerdo a la reacción (1).



La reacción (1) es catalizada enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD) y por vía no enzimática la reacción se favorece a valores altos de pH. Otra reacción de

importancia se da con el ácido ascórbico, que también constituye una línea de defensa adicional a la SOD contra el superóxido y que toma gran importancia debido a que el ácido ascórbico se encuentra en relación 4:1 con respecto a la SOD.

3.1.3 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La mayor parte del peróxido de hidrógeno intracelular proviene de la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ (reacción (1)). Sin embargo, existen otras fuentes como las reacciones catalizadas por la glicolato oxidasa y la monoamina oxidasa. Al igual que el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el peróxido de hidrógeno es una especie poco reactiva sin embargo puede atravesar la membrana celular y reaccionar con metales de transición, tales como Fe^{2+} y Cu^+ , para formar el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Figura 2), el cual resulta muy nocivo para el organismo. El peróxido de hidrógeno es capaz de inhibir la actividad de varias enzimas de la glucólisis, y en altas concentraciones puede oxidar a los grupos tiol ($-\text{SH}$) de las proteínas y causar ruptura de las cadenas del ADN. Por acción de la mieloperoxidasa, el H_2O_2 genera el HOCl , una especie soluble en lípidos, altamente reactiva, que rápidamente oxida a los constituyentes de las proteínas, incluyendo a los grupos tiol, los grupos amino y la metionina.

Con respecto a las defensas que presenta la célula contra el H_2O_2 , se encuentran la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa y la peroxirredoxina (Prx), que junto con la SOD conforman la mayor defensa antioxidante de las células (Figura 2).

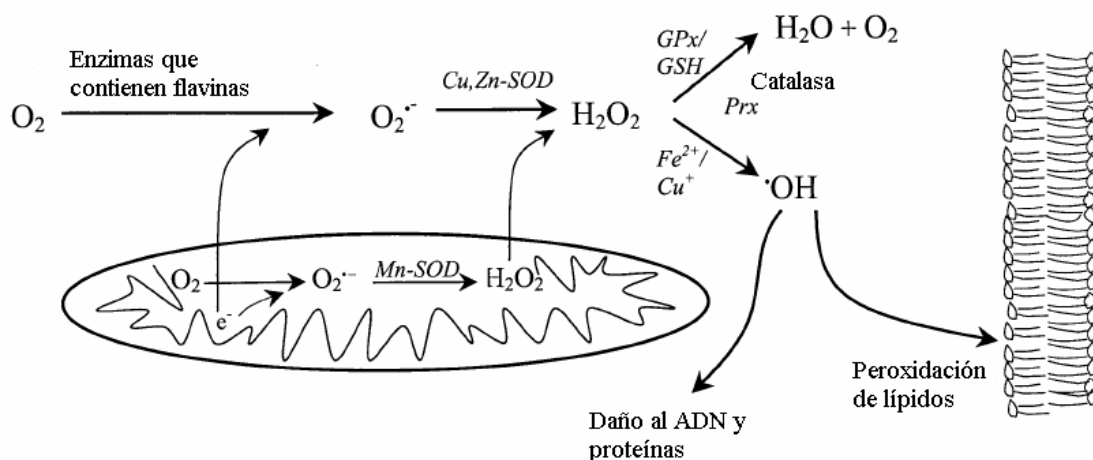
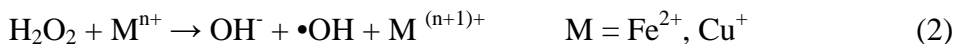


Figura 2. Procesos enzimáticos de formación y degradación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la célula. Imagen extraída de [10]. Nótese la cantidad de defensas enzimáticas con las que cuenta la célula para evitar a toda costa la formación del radical $\cdot\text{OH}$ que resulta sumamente perjudicial a las funciones celulares del organismo.

3.1.4 Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) es sin duda la EROS más reactiva y dañina que existe, puede formarse por métodos físicos como exposición a radiaciones de alta energía, por la ruptura homolítica del agua, pero principalmente por la reacción de Fenton, que utiliza al H_2O_2 en presencia de metales de transición como material de partida, reacción (2).



El $\text{O}_2^{\bullet-}$ juega un papel importante tanto al regenerar la forma reducida del metal, reacción (3), como produciendo el radical hidroxilo a través de su reacción con el peróxido de hidrógeno, reacción (4), por lo que al conjunto de reacciones (3) y (4) se les conoce como reacciones de Haber-Weiss.



La peligrosidad de esta especie radical se debe a que puede interactuar con prácticamente cualquier biomolécula siendo las constantes cinéticas de rapidez (k) del orden de 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A diferencia de las EROS estudiadas antes, no existen mecanismos de defensa específicos *in vivo* para detener la acción del radical $\bullet\text{OH}$.

3.1.5 Óxido nítrico (NO^{\bullet})

El óxido nítrico es un compuesto de vital importancia en el organismo ya que en las cantidades adecuadas desempeña diversas funciones útiles. El NO^{\bullet} se sintetiza en las neuronas del sistema nervioso central donde actúa como neuromodulador en la memoria y en la coordinación de la actividad neuronal, así como en la regulación del flujo sanguíneo y en la modulación del dolor. El óxido nítrico se forma *in vivo* a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa. Entre los efectos adversos del óxido nítrico, esta su reacción con el anión radical superóxido ($k = 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para formar el anión peroxinitrito (Figura 3) el cuál tiene una alta citotoxicidad y sirve como precursor de otras EROS^[13]

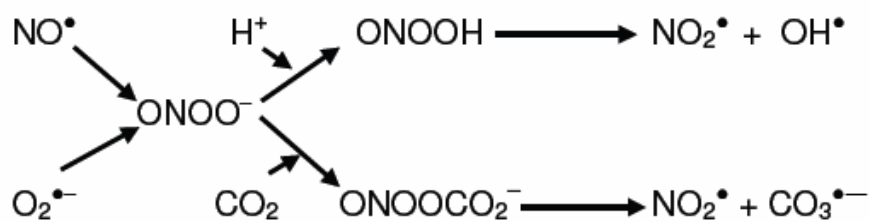


Figura 3. Producción de peroxinitrito y sus EROS derivadas.

El peroxinitrito debe su alta citotoxicidad principalmente a su reacción con las lipoproteínas de baja densidad (LDL), a la escisión de iones cobre de los centros activos de varias enzimas, al ataque sobre los residuos de tirosina que constituyen a las proteínas, así como en la producción de un gran número de especies dañinas como son el radical OH^\bullet y el peroxocarboxilato (Figura 3).

3.2 Daño provocado por las EROS

La producción de EROS dentro del organismo es parte de diversos procesos fisiológicos naturales, sin embargo cuando éstas se encuentran en exceso pueden dañar al organismo de tres formas principales^[9]; la primera de ellas es el ataque directo a las bases nitrogenadas que forman al ADN, lo que puede desencadenarse en diversas mutaciones y carcinogénesis^[3,4], la segunda forma es la reacción con los aminoácidos que conforman a las proteínas y como se ha visto, el tipo de aminoácido afectado dependerá en gran medida de la EROS que produce el daño. Además del daño individual a los aminoácidos, las EROS pueden provocar la ruptura de los enlaces peptídicos y la agregación de proteínas, las que adicionalmente pueden sufrir la reacción con los intermediarios generados durante la reacción de EROS con los lípidos. Por último, el tercer tipo de daño que provocan las EROS es la oxidación de los lípidos, que es el proceso que se lleva a cabo con mayor facilidad debido al elevado número de lípidos presentes en los organismos vivos y en gran variedad de productos alimenticios de interés industrial y comercial. Las reacciones de los lípidos se estudian con una mayor profundidad en la sección siguiente.

3.3 Oxidación de los lípidos.

Las funciones biológicas de los lípidos son variadas^[14] ya que pueden actuar como cofactores de diversas enzimas, acarreadores de electrones, pigmentos receptores de luz, agentes emulsificantes, hormonas y mensajeros intracelulares. Sin embargo, de todas éstas funciones destacan el almacenamiento de energía cuando las reservas de carbohidratos se agotan y el rol estructural que juegan conformando las membranas celulares en forma de fosfolípidos y esteroides, por lo que los lípidos se encuentran presentes en un amplio margen en todos los organismos vivos, especialmente en forma de triglicéridos. Es justamente esa relativa abundancia la que hace a los lípidos más susceptibles a la descomposición oxidativa por las EROS^[3,4].

La oxidación lipídica se lleva a cabo por cuatro mecanismos distintos^[3,4,8]:

- a) Autooxidación.
- b) Fotooxidación.
- c) Reacciones asociadas a la lipooxigenasa.
- d) Oxidación lipídica catalizada por metales.

Sólo las dos primeras son directamente iniciadas por alguna de las formas del oxígeno, la tercera es de carácter enzimático, sin embargo las tres comparten el hecho de que el grado de oxidación de los lípidos de un producto alimenticio puede incrementarse dependiendo de la cantidad de EROS que se encuentren presentes en el medio. A continuación se explicará a detalle cada uno de estos mecanismos de oxidación lipídica.

3.3.1 Autooxidación de los lípidos^[3,4,8].

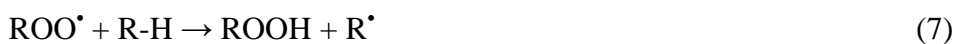
La autooxidación es la reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos en presencia de un iniciador de radicales, este suele ser el proceso más común por el que se da la oxidación y depende en gran medida de la cantidad de oxígeno presente, del área de contacto con el mismo (una fruta cortada en muchos trozos contiene mayor superficie que una con un solo corte), de la temperatura (a mayor temperatura mayor oxidación), del estado de los lípidos (un diacilglicerol es más fácil de oxidar que un triacilglicerol) y del grado de saturación del lípido (a menor saturación, mayor oxidación).

La autooxidación es una reacción que se lleva a cabo por radicales libres, donde generalmente las EROS son los iniciadores. Como toda reacción por radicales libres, en la autooxidación se distinguen tres etapas: iniciación, propagación y terminación, las cuales pueden visualizarse en el siguiente esquema de reacciones, donde R es un grupo lipídico y X[•], es una especie radical.

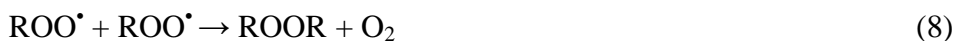
Iniciación:



Propagación:



Terminación:



Iniciación secundaria:



En el primer paso de iniciación tiene lugar la sustracción de un átomo hidrógeno por una especie radical, reacción (5), produciendo un radical lipídico R[•], capaz de reaccionar con O₂ para formar un radical peróxido lipídico, reacción (6). El peróxido

lipídico, ROO^\bullet , reacciona con otras moléculas de lípido, generando nuevos radicales R^\bullet , reacción (7), que reaccionan con oxígeno propagando así la reacción. Cuando la concentración de lípidos disminuye debido a la descomposición, es factible que dos especies radicales reaccionen para formar especies neutras con propiedades químicas distintas a los compuestos de origen, reacciones (8) a (10), a este tipo de reacciones se les conoce como reacciones de terminación. Estas reacciones tienen una importancia relevante, ya que los productos de dichas reacciones son los responsables del deterioro en el flavor y valor nutricional del alimento (Figura 4).

Si bien es cierto que la mayoría de las reacciones de autooxidación de los lípidos se inician por EROS, a medida que la concentración de peróxidos aumenta éstos se convierten en nuevos iniciadores para la reacción de autooxidación, reacciones (11) y (12).

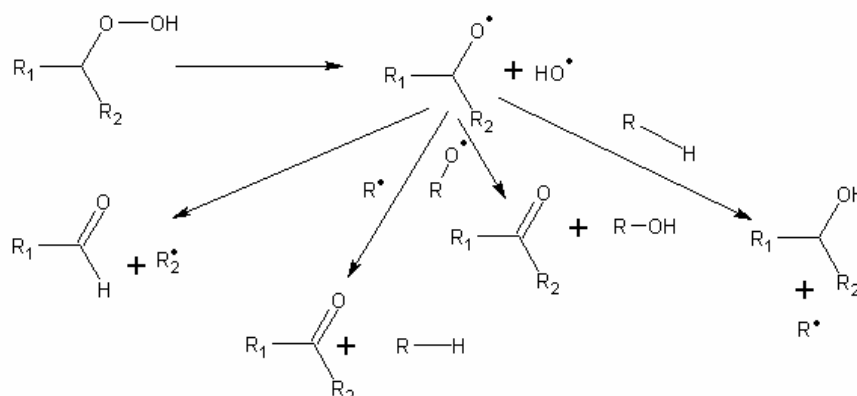


Figura 4. Adaptada de [8]. Diversos productos de descomposición de los peróxidos lipídicos.

Adicionalmente a lo antes mencionado, otra característica de las reacciones de autooxidación es que presentan un periodo de inducción (PI), que es el intervalo de tiempo en el que no se presentan cambios detectables en los lípidos en cuanto a su estado de oxidación (Figura 5), la duración de este período es muy sensible a varios componentes presentes que pueden actuar como prooxidantes, es decir incrementando la velocidad de la reacción de oxidación, o como antioxidantes que reducen la velocidad de éstos procesos.

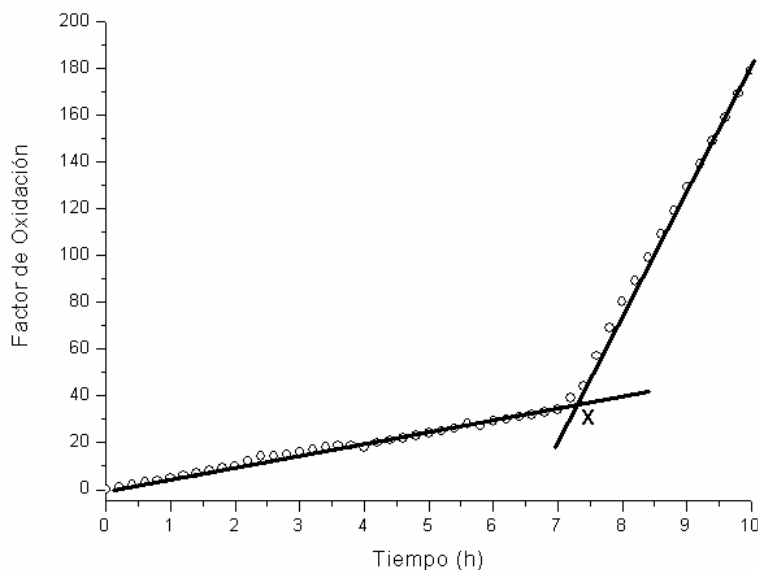
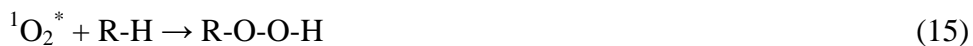


Figura 5. Gráfica hipotética de la oxidación de un producto alimenticio, el factor de oxidación puede ser absorbancia en el caso de compuestos coloridos, cuentas por minuto u otra variable dependiendo del método con el que se mida el deterioro oxidativo. El punto marcado con X indica el PI específico del producto alimenticio que está relacionado con la cinética de esta reacción.

3.3.2 Fotooxidación de los lípidos^[3,4,8].

La fotooxidación es una ruta alterna a la autooxidación para la degradación de lípidos y al igual que en el caso de la autooxidación, se lleva a cabo una producción de radicales libres, pero en esta ocasión iniciada por la luz y un agente sensibilizante adecuado, éste tipo de reacciones carecen de PI.

Las sustancias sensibilizantes en estas reacciones son: la riboflavina, las clorofilas y las hematoporfirinas, las cuales son capaces de transformar al oxígeno, de triplete a singulete, por transferencia de la energía absorbida a diversas longitudes de onda. El mecanismo por el que ocurre esto se detalla en las reacciones (13)-(15):



En la reacción (13) el sensibilizante (S), se excita por medio de energía luminosa, pasando al estado de triplete excitado, el cual puede transferir su energía al oxígeno molecular triplete, produciendo al sensibilizante excitado y a la molécula de oxígeno como singulete, reacción (14). Finalmente, el oxígeno singulete reacciona con los lípidos que se encuentran en el medio formando peróxidos lipídicos.

3.3.3 Oxidación por lipooxigenasa^[3,4].

Otra ruta que lleva hacia la formación de los hidroperóxidos es la reacción entre el oxígeno y un lípido insaturado catalizada por la lipooxigenasa (Linoleato oxígeno oxidoreductasa (EC1.13.11.12)). Esta enzima oxida específicamente a los ácidos poliinsaturados que contienen un metileno entre dobles enlaces, como es el caso del ácido linolénico y araquidónico (Figura 6).

La forma nativa de la lipooxigenasa contiene un átomo de hierro que se encuentra en estado de Fe^{2+} ; para que la enzima sea activa, es necesario oxidarlo a Fe^{3+} , y esto se consigue por la reacción con algún peróxido. Así, se ha observado que en los aceites sumamente puros hay un periodo de latencia, debido a que la enzima se encuentra inactiva, hasta que la reacción con un peróxido formado por otras vías la activa.

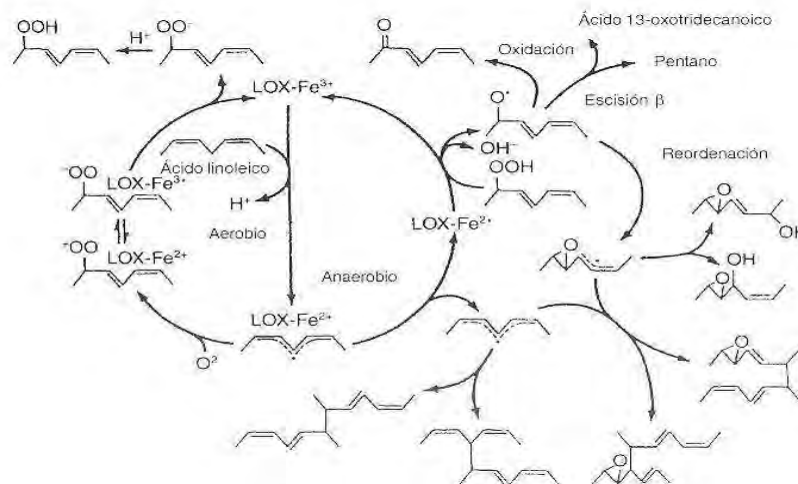


Figura 6. Mecanismo de oxidación de ácidos grasos por la lipooxigenasa.

La lipooxigenasa puede encontrarse en un sinnúmero de alimentos, siendo la mejor caracterizada la de la semilla de soya, la cual presenta diversas isoformas, que se clasifican en tipo I y tipo II, la diferencia en ellas radica en la zona óptima de pH, las

isoformas de tipo I funcionan en pH alcalinos, mientras que las de tipo II en la zona de pH neutro.

En muchas ocasiones se encuentran presentes en los alimentos pequeñas cantidades traza de metales de transición, los cuales debido a su amplia gama de estados de oxidación contribuyen a la formación de gran cantidad de radicales alcoxilo, los que pueden entrar en la etapa de propagación de la autooxidación de los lípidos. La facilidad con la que los metales producen radicales libres es debido a que la energía de activación para la ruptura homolítica de los peróxidos disminuye de 184 kJ/mol a solo 63-104 kJ/mol. En este caso el mecanismo por el que se da la oxidación lipídica, reacciones (16) y (17), es un proceso que implica la continua regeneración del metal. Esta regeneración no se da en un 100% debido a la interacción del metal con las diversas especies nucleofílicas presentes en el medio celular, aunado a que la regeneración de la especie reducida ocurre vía formación de un radical peróxido lipídico en una reacción demasiado lenta comparada con el consumo del metal para formar el radical alcoxilo.



3.4 Conceptos básicos de los antioxidantes^[3,4,8,15,16].

Hasta este momento hemos hablado de todos los mecanismos y factores que provocan la oxidación y deterioro de las biomoléculas tanto en los organismos vivos como en los alimentos. Sin embargo viene a nuestra mente ¿Cómo logran los organismos defenderse de las EROS? y ¿cómo evitan que la propagación de radicales libres generados por las EROS inicien todas las reacciones en cadena antes mostradas? La respuesta a estas interrogantes, se encuentra en los compuestos llamados antioxidantes. Un antioxidante se define como cualquier sustancia que es capaz de aplazar, retardar o prevenir el periodo de oxidación de las biomoléculas constituyentes de un alimento u organismo. En los alimentos, los antioxidantes retardan los sabores inadecuados, alargando el PI, por lo que su adición al final de este periodo no retarda en absoluto el enranciamiento.

3.4.1 Tipos y mecanismos de antioxidantes^[3,4,8,15,16].

Debido a la función que cumplen los antioxidantes estos se clasifican como antioxidantes primarios, antioxidantes secundarios y compuestos sinergistas.

3.4.1.1 Antioxidantes Primarios

Los antioxidantes primarios se encargan de donar átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres generados por las EROS o por la peroxidación lipídica, convirtiéndolos en productos más estables, interrumpiendo la propagación de las reacciones en cadena. Muchos de los antioxidantes naturales ó sintéticos que presentan la funcionalidad fenol en alguna parte de su estructura, entran en esta definición de antioxidantes primarios, debido a su gran habilidad como atrapadores de radicales libres.

En su mecanismo de acción los antioxidantes primarios pueden inhibir la fase de iniciación de la peroxidación lipídica al reaccionar con un radical alquilo, o bien pueden inhibir los pasos de propagación al reaccionar con un radical peróxido lipídico o con un radical alcoxilo, reacciones (18) a (20), en donde AH representa al antioxidante.



Adicionalmente los radicales libres del antioxidante (A^{\bullet}) pueden interferir con los pasos de propagación formando compuestos estables, reacciones (21) y (22).



Una acción característica de este tipo de antioxidantes es que el PI y la duración de este periodo es siempre proporcional a la concentración del mismo, por lo que se empiezan a observar deterioros debidos a la oxidación a partir de que el 90% de la concentración del antioxidante se ha consumido.

3.4.1.2 Compuestos sinergistas.

Los compuestos sinergistas se dividen en dos amplias categorías, la primera de ellas la conforman los compuestos con propiedades quelantes y el segundo grupo lo forman los compuestos capaces de reaccionar con el oxígeno molecular. La acción de los sinergistas es de vital importancia ya que en muchos casos ayudan a la regeneración efectiva del antioxidante primario, regresándolo a su forma reducida.

Si bien los agentes quelantes no actúan como antioxidantes, atrapando radicales libres, su función es interferir con los metales prooxidantes como cobre y hierro que aunque están presentes en cantidades traza, resultan ser excelentes formadores de radicales libres. Entre los agentes quelantes más utilizados se encuentran el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), el ácido cítrico, los aminoácidos (Figura 7) y los fosfatos.

El ácido ascórbico, el palmitato de ascorbilo, el ácido tartárico (Figura 7) y los sulfitos, son compuestos capaces de reaccionar con el oxígeno libre y mantenerlo alejado del sistema. Este sinergismo en particular se presenta en los cítricos, y es la razón del por qué cuando se añade limón a algunos preparados como el guacamole, no se observa un grado apreciable de oxidación hasta pasado cierto tiempo.

El parámetro que caracteriza a la actividad sinérgica ecuación (23) se denomina S y se define por:

$$S = PI_{1,2} - (PI_1 + PI_2) > 0 \quad (23)$$

Donde $PI_{1,2}$ es el periodo de inducción en presencia de ambos inhibidores y PI_1 y PI_2 son los periodos de inducción en presencia de cada inhibidor individual. En donde el porcentaje de sinergismo se define de acuerdo a la ecuación (24).

$$\%S = \frac{P_{1,2} - (PI_1 - PI_2)}{PI_1 + PI_2} \quad (24)$$

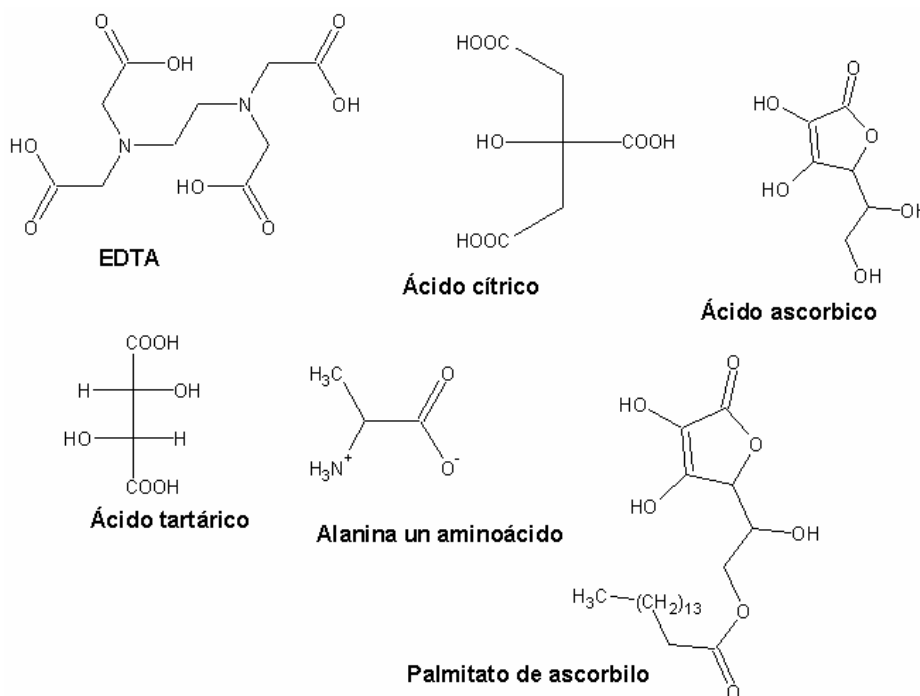
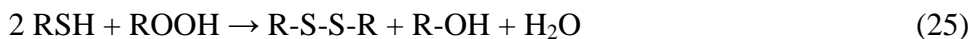
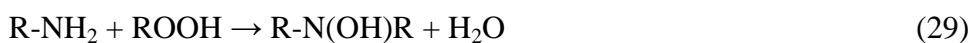


Figura 7. Principales compuestos sinérgicos.

3.4.1.3 Antioxidantes secundarios.

Los antioxidantes secundarios, son sustancias que por reducción y/o donación de hidrógeno descomponen a los hidroperóxidos, formando productos estables como los alcoholes. En general todos los compuestos de azufre como los tioles, los sulfuros y disulfuros son inhibidores activos de la autooxidación (reacciones (25) a (29)).





La secuencia de reacciones (25)-(26) muestra que los tioles tales como la cisteína o el glutatión, son capaces de oxidarse a disulfuros, reacción (25), los sulfuros como la metionina o el ácido 3,3'-tiodipropiónico se oxidan a sulfóxidos, reacción (26), los disulfuros se oxidan a tiosulfatos, reacción (27), y los sulfóxidos pueden reaccionar con otras moléculas de hidroperóxido formando sus respectivas sulfonas, reacción (28). Por último los grupos aminos libres de las proteínas pueden reaccionar con los hidroperóxidos libres, reacción (29), para formar iminas por posterior deshidratación.

A pesar de la efectividad que han mostrado estos compuestos, su uso sigue siendo de gran polémica debido a la hipersensibilidad que presentan algunas personas frente a este tipo de compuestos^[15, 17,18]. Entre los síntomas que se presentan por el consumo excesivo de compuestos sulfurados, se encuentran: náusea, dolor de cabeza, mareo, diarrea y en los peores casos shock y muerte, por lo que la presencia de estos compuestos debe de estar forzosamente incluida en la etiqueta de los productos.

3.4.2 Antioxidantes naturales vs. Antioxidantes sintéticos. ^[3,4,8,15,16,18]

A pesar de que en la actualidad se cuenta con una gran cantidad de antioxidantes sintéticos, éstos no han logrado sustituir a los que se obtienen por fuentes naturales, principalmente de frutas, vegetales y semillas. La preferencia de este tipo de compuestos sobre los de origen sintético, se debe a las nuevas tendencias que influyen en el consumidor, las cuales sostienen que los alimentos que contienen componentes sintéticos resultan a la larga perjudiciales en la salud del organismo. Se considera que los antioxidantes que se extraen de fuentes naturales son totalmente inocuos debido a que los hemos venido consumiendo en la dieta durante miles de años. Es por ello que en la presente tesis, se dará un mayor énfasis en las diversas clases de antioxidantes naturales que contienen las frutas y verduras, y la importancia de los mismos como defensa frente al fenómeno del oscurecimiento enzimático, dejando a un lado los antioxidantes sintéticos como los galatos y diversos fenoles.

3.5 Principales antioxidantes naturales presentes en frutas, verduras y semillas.

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino de las plantas y se consideran como metabolitos secundarios, además estos compuestos son por mucho la principal defensa antioxidante no enzimática frente a las EROS. El contenido de compuestos fenólicos en las frutas y verduras es variable y depende del tipo de planta de donde provienen, del tipo de siembra y de las condiciones ambientales del lugar donde se cosecha, por lo que siempre es recomendable una dieta que incluya varios tipos de verduras y frutas, a fin de cubrir todas las demandas de compuestos antioxidantes que el organismo requiere, ya que los animales superiores no somos capaces de sintetizar este tipo de compuestos. Entre los antioxidantes fenólicos naturales de mayor abundancia se encuentran los tocoferoles, los derivados de los flavonoides y los derivados de los ácidos benzoico y cinámico, de los cuales se hablará con mayor profundidad en las siguientes secciones.

3.5.1 Los tocoferoles.

Los tocoferoles comprenden un grupo de compuestos químicos relacionados entre sí; los tocoferoles y los tocotrienoles los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos de las plantas (de 500-1000 mg/kg), especialmente en nueces, aceites vegetales, frutas y verduras. Algunas fuentes especialmente ricas en tocoferoles son el germen de trigo, el maíz, el aceite de soya y la lechuga.

Los tocoferoles y los tocotrienoles presentan homólogos α -, β -, γ - y δ - por lo que los 8 compuestos forman en conjunto el complejo de la vitamina E. La unidad estructural básica en todos los homólogos es un anillo de 6-cromanol con una cadena lateral de fitol (Figura 8). Los homólogos difieren entre sí solamente en el número y posición de los grupos metilos unidos al anillo aromático, mientras que en el caso de los tocotrienoles, la diferencia es la presencia de tres insaturaciones en las posiciones 3',7' y 11' de la cadena lateral del fitol.

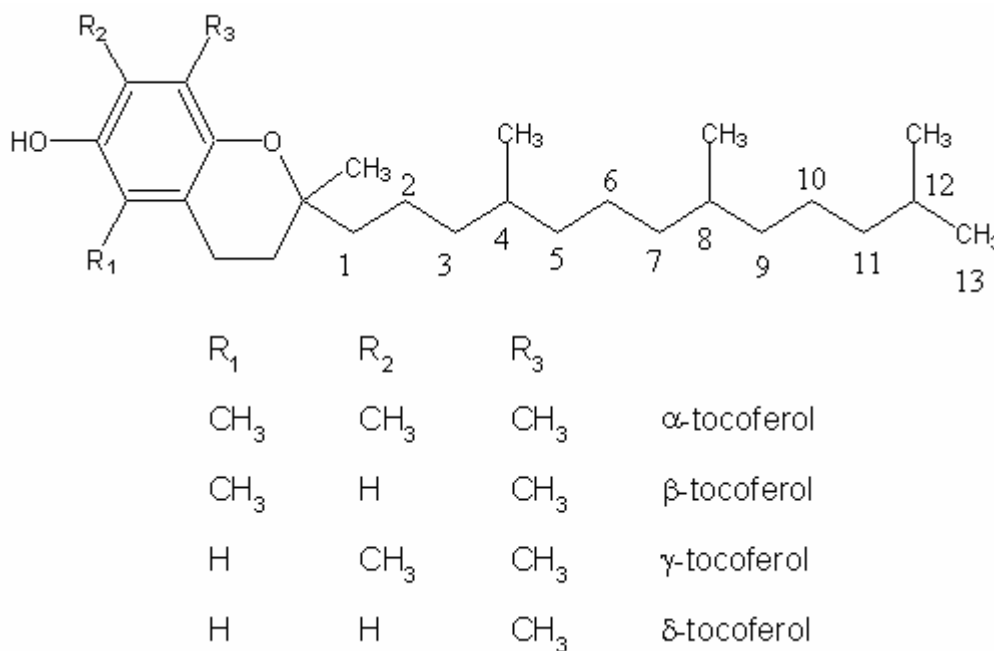


Figura 8. Diferencias estructurales entre los diversos homólogos de los tocoferoles.

Los tocoferoles (TOH) actúan como antioxidantes donando un átomo de hidrógeno del grupo fenólico a los radicales peroxilo, reacción (30), el nuevo radical del tocoferol, TO•, puede estabilizarse por resonancia a través del anillo aromático y posteriormente puede formar productos no radicales, que incluyen peróxidos estables, reacción (31), y dímeros de tocoferol, reacción (32). En el esquema de reacciones (30)-(32) se muestran las principales vías de defensa antioxidante.



A condiciones fisiológicas el orden de actividad antioxidante que se observa en los tocoferoles es: α- > β- > γ- > δ-, sin embargo a temperaturas entre 50-100°C se observa el orden inverso. El α-tocoferol es el miembro más abundante de toda la serie y su actividad biológica es cerca de dos veces mayor que en el caso de los homólogos β- y γ-, mientras que es cerca de 100 veces mayor que en el caso del homólogo δ-. En cuanto a su aspecto físico los tocoferoles son sustancias de amarillo pálidas a claras, son

sustancias viscosas y de consistencia aceitosa insolubles en agua pero si en aceites. A pesar de que el α -tocoferol puede sintetizarse ya sea en su forma libre o con el grupo hidroxilo esterificado en forma de acetato para su mejor manejo y estabilidad, sólo se ha logrado obtener la mezcla racémica, la que debido a la gran especificidad de los sistemas biológicos resulta menos eficaz que el compuesto natural.

3.5.2 Compuestos derivados de los flavonoides^[3,4,8,15].

Los flavonoides son un grupo de sustancias fenólicas de origen vegetal que se caracterizan por tener un esqueleto carbonado del tipo: C₆-C₃-C₆ (Figura 9). La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres átomos de carbono que ha sido condensada para formar un pirano o en algunas ocasiones un furano. Varias subclases de compuestos se han identificado en base a los patrones de sustitución y a las posiciones de los anillos B y C (Figura 9). Los subgrupos principales son: flavonoles, flavonas, isoflavonas, catequinas, proantocianidinas y antocianinas. Las chalconas, las flavanonas, las leucoantocianinas y los dihidroflavonoles son los precursores comunes para los diferentes grupos en las vías biosintéticas.

Los flavonoides presentan actividad antioxidante por diversos mecanismos:^[19] pueden reaccionar con los radicales peróxido lipídicos, en otros casos pueden actuar como agentes acomplejantes de metales y como atrapadores de oxígeno. Para que una molécula flavonoide posea una máxima efectividad de captación de radicales, deben cumplirse una serie de requisitos, entre los que se pueden mencionar: a) una estructura 3',4'- dihidroxi en el anillo B, b) un enlace doble 2,3 en conjunto con un grupo 4-oxo en el anillo C, c) la presencia de un grupo 3-hidroxilo en el anillo C y d) un grupo 5-hidroxilo en el anillo A. Aunque los flavonoides que poseen un único grupo hidroxilo actúan como grupos atrapadores de radicales libres, se ha observado que la presencia de grupos hidroxilo múltiples, especialmente en el anillo B, aumenta la actividad antioxidante.

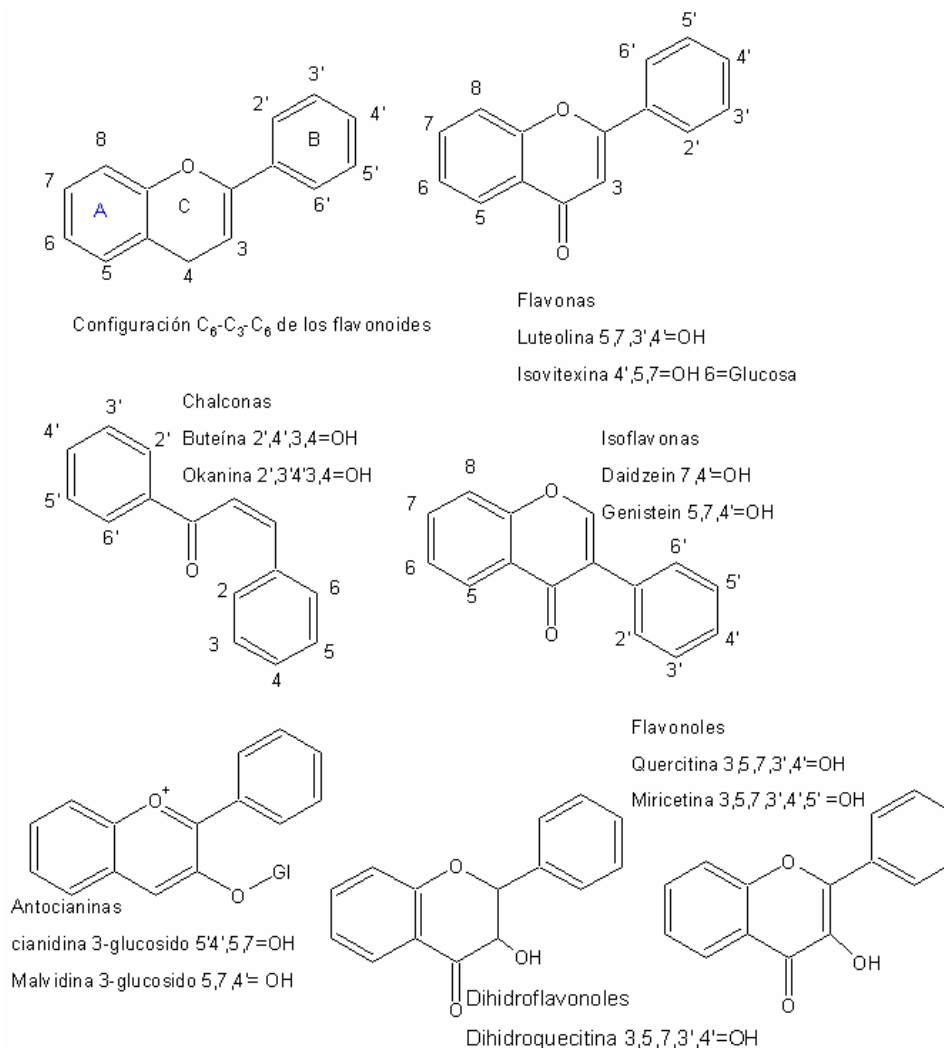


Figura 9. Estructuras de compuestos relacionados a los flavonoides.

3.5.3 Derivados *o*-difenólicos de los ácidos benzoico y cinámicos^[3,15,16]

El último grupo de compuestos antioxidantes lo forman los compuestos *o*-difenólicos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico (Figura 10). Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas ya que contribuyen en procesos vitales como en la formación de las paredes celulares y como precursores sintéticos de los flavonoides.

Con respecto a su capacidad antioxidante, los derivados del ácido cinámico presentan mayor actividad^[20] que los derivados del ácido benzoico y son por mucho la clase de antioxidantes más comunes en las plantas^[21] en especial el ácido cafeico y el ácido clorogénico.

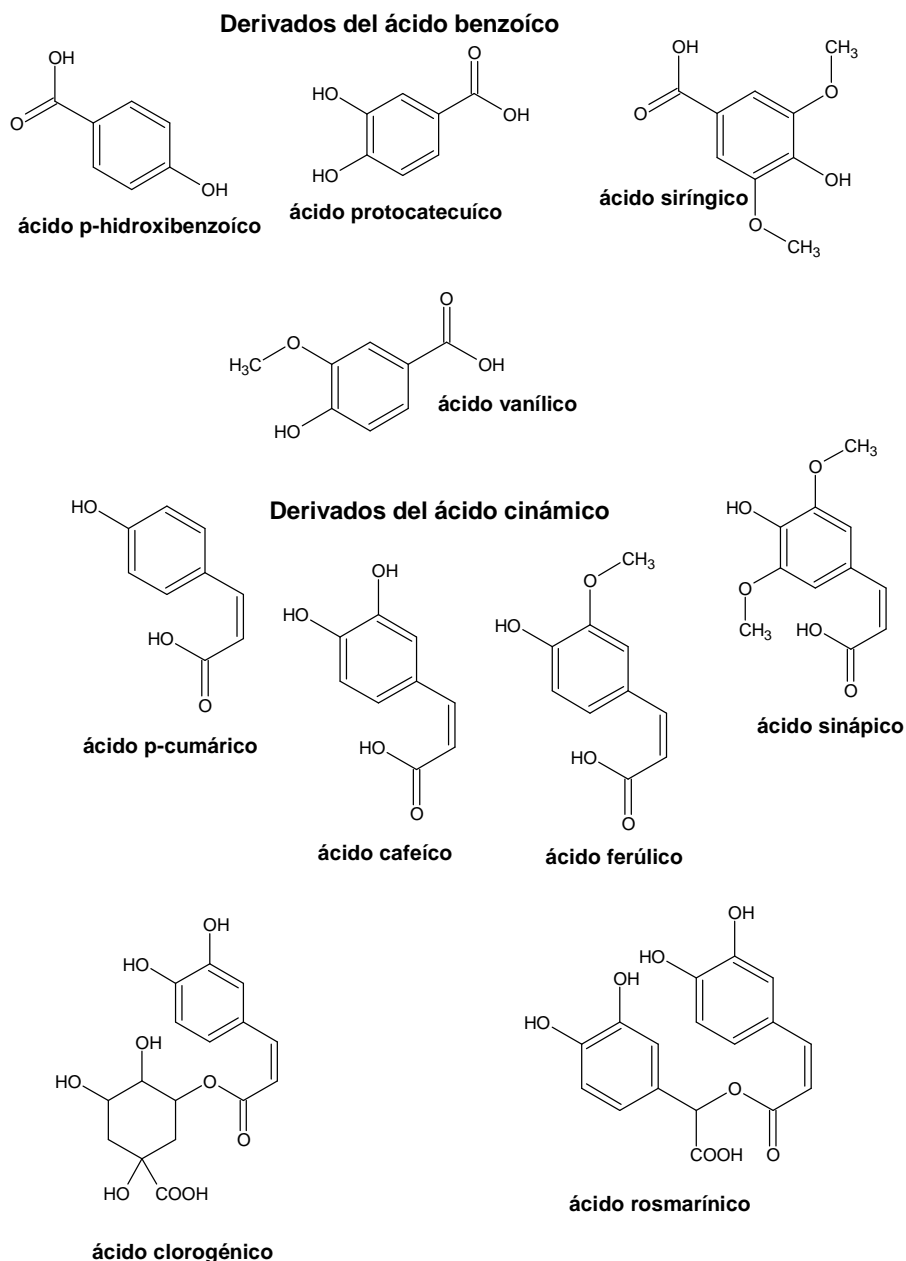


Figura 10. Diversos compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico.

El ácido clorogénico es el compuesto que se encuentra con mayor recurrencia en una amplia gama de vegetales^[3,22-24] como en los frijoles, papas, manzanas, en las hojas de tabaco, cebollas^[25] y en otros productos como los vinos^[26], que resultan ser fuentes ricas de este tipo de moléculas antioxidantes. También se encuentra en la mayor parte de las especias que se usan para sazonar los alimentos,^[3,27] por lo que podemos darnos cuenta de la gran influencia de los compuestos fenólicos en la dieta humana.

Los compuestos fenólicos combaten la oxidación de acuerdo a tres mecanismos generales:

a) Previniendo los procesos de iniciación de la peroxidación lipídica.

Los compuestos fenólicos al presentar esta funcionalidad son capaces de reaccionar directamente con los radicales formados durante la peroxidación lipídica, tanto en la fase de iniciación como en la de propagación o con las EROS, con lo que cumplen la función de antioxidantes primarios. La eficacia de los compuestos fenólicos se demuestra al observar, por ejemplo, la magnitud de las constantes de rapidez de ácido clorogénico con diversos tipos de especies radicales (Tabla 2) ^[15,21].

Tabla 2. Constantes de rapidez del ácido cafeico y en algunos casos de su éster el ácido clorogénico con diversas EROS.

EROS	Compuesto/ constante de velocidad ($M^{-1} s^{-1}$)
Peroxilo lipídico R-O-O [•]	1.5×10^7
Superóxido O ₂ ^{•-}	9.6×10^7
Hidroxilo OH [•]	3.24×10^9
Peroxinitrito NO-O [•]	Quinona del clorogénico 1.6×10^5
Dióxido de nitrógeno NO ₂ [•]	8.6×10^8
N ₂ O ₃ Trióxido de dinitrógeno	8.6×10^9
Oxígeno singulete ¹ O ₂	5.1×10^6

b) Regeneración de tocoferoles.

Los compuestos fenólicos simples son capaces de regenerar los tocoferoles consumidos en los diversos procesos oxidativos del organismo^[3,28], por reducción del radical tocoferilo, en presencia de ácido ascórbico.

c) Quelación de metales.

Los compuestos fenólicos en presencia de metales de transición como el Fe³⁺/Fe²⁺ y Cu²⁺ pueden actuar como ligantes, inhibiendo los procesos de formación de radicales •OH, por medio de reacciones tipo Fenton.

Como puede observarse, la importancia de los compuestos fenólicos como agentes antioxidantes es vital para la defensa del organismo contra las EROS, sin embargo la abundancia de este tipo de compuestos, hace que el producto alimenticio sea susceptible a un proceso de deterioro adicional a la peroxidación lipídica y que suele ser igual de

destruccion con las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos. Este otro proceso se conoce como oscurecimiento enzimático, en el que los compuestos fenólicos, son precisamente los sustratos del proceso de deterioro enzimático.

3.6 Oscurecimiento en productos alimenticios.^[15,18,29,30]

El oscurecimiento en frutas y verduras es un proceso común que ocurre en una gran diversidad de alimentos en especial en frutas y verduras, así como en algunos productos de origen animal como los camarones. Este proceso puede ser de origen enzimático o no enzimático y se caracteriza por la aparición de colores que van de amarillentos a café oscuro en la superficie del producto expuesta al ambiente, aunado a que las propiedades sensoriales y nutricionales del alimento se ven ampliamente afectadas. Si bien en algunos productos como las hojas del tabaco o de té éste no es un proceso indeseable, no obstante en la mayoría de los casos se convierte en algo desfavorable ya que afecta en gran medida el valor comercial del producto.

3.6.1 Oscurecimiento enzimático^[15,18,29]

Este tipo de oscurecimiento se lleva a cabo cuando las células que componen al alimento se fracturan ya sea por un cambio brusco de temperatura (como ocurre con los alimentos congelados) o por medios mecánicos (como la agitación o el corte con algún instrumento), lo que lleva a la ruptura de los diversos compartimentos celulares ocasionando que los compuestos fenólicos se liberen de sus vacuolas y entren en contacto con las enzimas citoplásmicas, las que en presencia de oxígeno del aire inician el proceso de oxidación.

Dos clases de enzimas son las causantes de catalizar este proceso de oxidación y se conocen genéricamente con el nombre de polifenol oxidasas (PPO). Esta clase de enzimas se encuentran presentes en algunas bacterias y artrópodos pero sobretodo en la mayoría de las plantas y en todos los mamíferos incluyendo al ser humano. Las PPO se encuentran generalmente en los cloroplastos y en algunos casos presentan formas solubles en el citoplasma, su tamaño varía de 57 a 62 kDa.

La primera clase de PPO es la catecolasa (1,2-bencenodiol: oxígeno-oxidoreductasa. E.C1.10.3.1) que cataliza dos tipos de reacciones (Figura 11): i) la hidroxilación de monofenoles para dar *o*-hidroxifenoles (actividad cresolasa) y ii) la oxidación de estos compuestos a *o*-quinonas. Ambos tipos de reacciones emplean oxígeno como cofactor. Cabe mencionar que la mayoría de las veces la actividad cresolasa se pierde durante la purificación, por lo que en diversos preparados la razón de la actividad catecolasa sobre la cresolasa puede ser de 1 a 40.

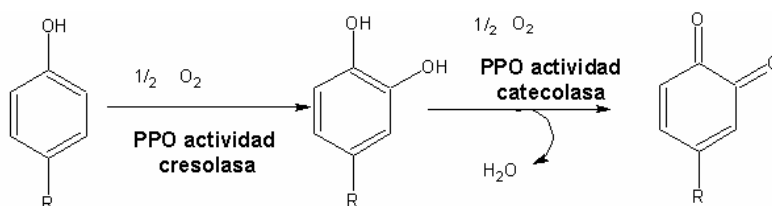


Figura 11. Reacciones de oxidación de sustratos fenólicos por la PPO.

La segunda clase de PPO recibe el nombre de lacasa (bencenodiol: oxígeno-oxidoreductasa E.C1.10.3.2) y cataliza la reacción de oxidación tanto de *o*-hidroxifenoles como de *p*-hidroxifenoles a sus respectivas quinonas (Figura 12).

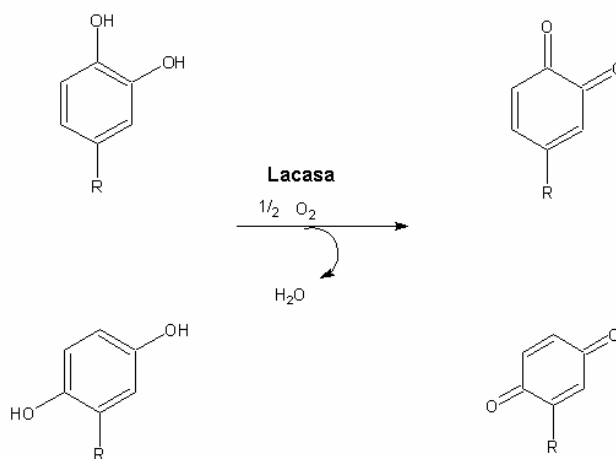


Figura 12. Acción de la lacasa sobre distintos sustratos fenólicos.

La característica estructural más importante de estas enzimas es la presencia en su centro activo de dos átomos de cobre, unidos cada uno de ellos a tres residuos de histidina (Figura 13) ^[31]. En su entorno se sitúan una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes para la unión de los sustratos.

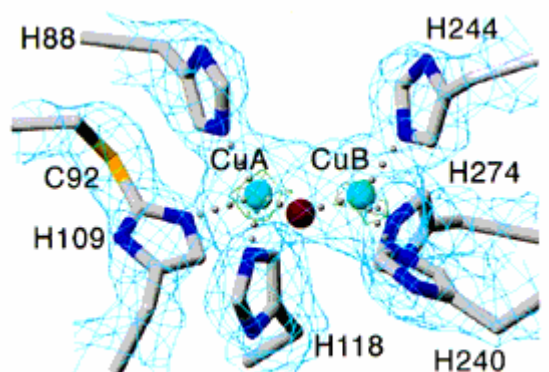


Figura 13. Estructura de las PPO.

El pH óptimo de estas enzimas es variable y se encuentra en el intervalo de 4 a 7 dependiendo de la fuente de donde se obtiene la enzima y de la proporción de isoenzimas.

Entre la amplia cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran en frutas y verduras, solo los monofenoles o difenoles sirven como sustratos directos de las PPO. Los derivados del ácido cafeico y 3-flavonoles son comúnmente los mejores sustratos. Otras clases de compuestos fenólicos como son las flavonas y taninos son sustratos más bien de carácter débil, debido probablemente al impedimento estérico ocasionado por el tamaño propio de estos compuestos y de sus diversos sustituyentes. Si bien esta clase de compuestos no son sustratos directos pueden causar gran parte de este oscurecimiento actuando en reacciones de oxidación acopladas. Se cree que en este tipo de reacciones catalizadas por la PPO, el oxígeno se une primero a la enzima, los valores de las constantes de Michaelis aparentes (K_{Mapp}) para este proceso están en el intervalo de 0.1 a 0.5 mmol^{-1} y las correspondientes al sustrato se encuentran en el orden de 1 mmol^{-1} .

Las quinonas provenientes de la reacción enzimática de las PPO son muy reactivas y pueden formar una gran cantidad de compuestos coloridos por medio de sus reacciones con otros componentes nucleofílicos presentes en el medio celular, produciendo compuestos de alto peso molecular, conocidos como melaninas (Figura 14), que son los compuestos que imparten la coloración amarillo-café al alimento.

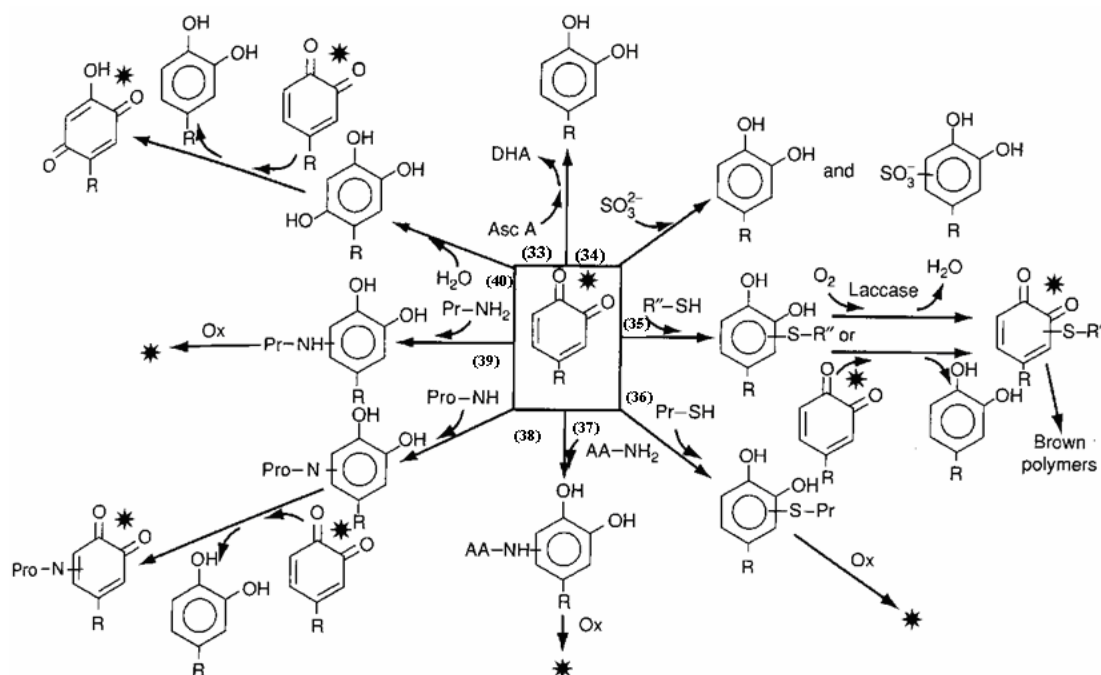


Figura 14. Imagen tomada de [15] Reacciones de *o*-quinonas con diversos compuestos que llevan a la formación de melaninas y compuestos coloridos que provocan el oscurecimiento enzimático. Todas las reacciones son de tipo no-enzimáticas excepto la de lacasa. Los productos coloridos causantes del oscurecimiento se muestran con asteriscos. Ox, oxidaciones con oxígeno molecular; Pr-SH y Pr-NH₂ proteínas. Pro-NH, prolina; AA-NH₂, aminoácidos; HAsc, ácido ascórbico; DHA ácido deshidroascórbico; R-SH compuestos pequeños tipo tiol.

3.7 Métodos empleados contra el oscurecimiento enzimático.

Para evitar los efectos indeseables del oscurecimiento enzimático se han desarrollado gran cantidad de procedimientos, los cuales pueden dividirse en tres tipos:

- a) Métodos de protección físicos.
- b) Protección contra el oxígeno.
- c) Métodos químicos.

3.7.1 Métodos de protección físicos.

Entre los métodos físicos de protección se encuentran aquellos relacionados a cambios en la temperatura del producto, por ejemplo el enfriamiento el cual debe de ser lo más rápido posible. Una vez que el producto se encuentra congelado (generalmente a temperaturas menores de 0 °C) el cambio de color es prácticamente nulo (temperaturas de -18 °C o menores) iniciándose éste al descongelar. Este método se aplica con particular eficiencia en hongos y en rebanadas de manzana y pera. El tratamiento

térmico también puede emplearse para inhibir la actividad enzimática de la PPO, en este caso, el producto se sumerge por algunos minutos en agua hirviendo o jarabes calientes donde se alcanzan temperaturas superiores a los 90 °C. A temperaturas mayores a 70 °C las PPO se inactivan y muestran su mayor resistencia al calentamiento alrededor de pH = 6, por lo que el calentamiento acompañado de valores inferiores de pH, suele ser efectivo.

Otros métodos físicos incluyen el tratamiento con radiación, la disminución del pH por electrodiálisis, la deshidratación y la aplicación de grandes presiones (400-500 MPa) con el fin de lograr la pérdida de las funciones de la enzima.

3.7.2 Protección contra el oxígeno.

El fundamento de esta técnica es mantener lo más alejado posible el oxígeno del producto alimenticio y con ello evitar que actúe como cofactor de las PPO. Esto se logra de muchas maneras, por ejemplo con empaques cerrados herméticamente, o empaques al vacío. Se ha observado que una presión de aproximadamente 380 mm de Hg es suficiente para mantener la mayoría de los alimentos en buen estado, la utilización de presiones demasiado altas afecta la textura y la apariencia de los alimentos. Otra opción es realizar el empaque del producto en una atmósfera pobre en oxígeno como puede ser bajo atmósfera de CO₂ ó N₂, donde este último ha resultado ser más efectivo debido a que conserva mejor el sabor y aroma de los productos.

3.7.3 Métodos químicos^[15,32].

Numerosos compuestos químicos inhiben el oscurecimiento enzimático, pero de todos ellos sólo algunos se consideran totalmente inocuos y no alteran las propiedades organolépticas de los alimentos, teniendo además un costo razonable, por lo que el uso de la mayoría de aditivos no se encuentra adecuadamente legislado.^[3]

En el caso de alimentos de origen vegetal, las legislaciones de muchos países permiten solo el uso del ácido ascórbico y sus derivados, de sales como el cloruro de sodio y el clorito de sodio^[33], y con estrictos límites los compuestos azufrados como son, el dióxido de azufre y los tioles^[34]. Recientemente se han atribuido propiedades favorables

y seguras al 4-hexilresorcinol como un compuesto contra el oscurecimiento enzimático^[35] especialmente aplicado a los cambios de color en camarones.

Los métodos químicos pueden clasificarse de acuerdo con su modo de acción primario en seis categorías, que serán detalladas a continuación.

3.7.3.1 Compuestos reductores.

Estos compuestos actúan reduciendo a los precursores de la pigmentación, reconvirtiendo por ejemplo las quinonas a fenoles, este efecto sin embargo es de carácter temporal, ya que estos aditivos se reducen de manera irreversible, produciendo especies químicas que modifican los sabores y olores de los alimentos. Entre los compuestos que pertenecen a esta familia se encuentra el ácido ascórbico y su isómero el ácido eritórbico. Otro de los inconvenientes de estos compuestos es su baja especificidad y penetrabilidad a la matriz celular de los alimentos. Se han utilizado también derivados fosfatados del ácido eritórbico que lo liberan al entrar en contacto con las fosfatasas, así como ésteres derivados de ácidos grasos como el palmitato, que si bien, a corto plazo presentan un efecto menor con respecto al ácido libre, su efecto es mayor en periodos de tiempo prolongados.

3.7.3.2 Agentes quelantes.

Como se mencionó anteriormente, la enzima PPO contiene cobre en su centro activo, por lo que el uso de agentes quelantes disminuye la cantidad de cobre libre para formar parte del centro activo de la enzima, provocando su inactivación. Entre los agentes quelantes más comunes se encuentran el EDTA (Figura 7), los polifosfatos (ATP y pirofosfatos) y macromoléculas (porfirinas y proteínas).

3.7.3.3 Agentes acidulantes.

El valor de pH óptimo para la PPO varía de especie a especie, pero en muchos casos se encuentra en el intervalo de 4 a 7 como en la lechuga^[36] y la uva Napoleón^[37], por lo que para inactivar la enzima se puede añadir una serie de agentes acidulantes que mantengan en el medio valores de pH inferiores al óptimo. Entre este tipo de

compuestos se encuentra el ácido cítrico que puede actuar también como agente quelante de cobre. Otros acidulantes importantes son los ácidos málico, tartárico y fosfórico, sin embargo la desventaja de estos últimos compuestos frente al ácido cítrico es su elevado costo y la modificación del sabor de alimentos.

3.7.3.4 Compuestos inhibidores de las PPO.

Existen reportados en la literatura una gran cantidad de compuestos que cumplen con esta función, sin embargo sólo pocos tienen una aplicación práctica en la industria alimentaria. Entre los compuestos que presentan esta actividad se encuentran los derivados alquílicos en posición 4 del resorcinol, en especial el 4-hexilresorcinol^[35] que tiene un valor de IC_{50} bajo (IC_{50} = concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática) y presenta baja toxicidad, por lo que se considera seguro para la salud. Estos derivados del resorcinol han resultado eficaces para evitar el oscurecimiento en camarones, rebanadas de manzana y guacamole, adicionalmente presentan ventajas sobre los sulfitos debido a la alta especificidad que presentan hacia la PPO. Otro tipo de compuestos útiles son los alcoholes alifáticos que inhiben la PPO conforme el número de carbonos que los constituyen aumenta de 2 a 5. Además de los alcoholes algunos péptidos pequeños (600 Da) como los que se encuentran en la miel de abeja son capaces de inhibir la actividad de la PPO. Los aniones inorgánicos como el Cl^- y Br^- inhiben la actividad de la enzima por modificación del sitio activo, mientras que algunos otros como el NO_3^- o el SO_4^{2-} no lo logran debido a su gran radio iónico. Otro compuesto común es el ácido kojico que fue descubierto entre los productos metabólicos de algunos hongos como el *Aspergillus Níger* y el *Penicillium* y que en combinación con el ácido ascórbico protege de manera extraordinaria a los alimentos, al grado de que se encuentra patentado, las desventajas es que resulta caro y en algunos casos tóxico.

3.7.3.5 Tratamientos enzimáticos.

Una opción para evitar el oscurecimiento enzimático es la modificación irreversible de los sustratos fenólicos por medio de la enzima bacteriana protocatecuicato 3,4-dioxigenasa (EC1.13.11.3), la cual cataliza la apertura del anillo y la fusión en posición *orto*- de los catecoles, ésta no ha sido muy empleada debido al costo que representa. La

catecol transferasa u *o*-metiltransferasa, es una enzima capaz de metilar la posición 3- de los compuestos 3,4-dihidroxiaromáticos, esta reacción es irreversible y provoca que la enzima PPO no pueda actuar sobre el sustrato. Las proteasas de plantas, tales como ficina, papaína y bromelaina son enzimas de amplia especificidad y se ha encontrado que son efectivas como inhibidores del oscurecimiento enzimático. Su efecto inhibitorio se atribuye a que se unen o hidrolizan sitios específicos necesarios para la actividad de la PPO.

3.7.3.6 Formación de complejos con los sustratos de la PPO.

Con esta clase de compuestos se logra inhibir el oscurecimiento enzimático mediante la formación de complejos con los sustratos de la PPO. Entre estos compuestos se encuentran el quitosan y las ciclodextrinas (CD). Las ciclodextrinas son los compuestos usados en esta tesis y de los que se hablará en la siguiente sección.

3.8 Aspectos generales de las ciclodextrinas (CD)^[38-41].

Las CD son compuestos oligosacáridos cíclicos de α -D-glucopiranososa que se obtienen a partir de la transformación del almidón por ciertas bacterias como *Bacillus Macerans* por la acción de la enzima glucosil transferasa. Estas estructuras se encuentran unidas por enlaces de tipo α -(1-4). Estos compuestos se conocen también como cicloamilosas, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger en honor a su descubridor. La estructura de las CD permaneció como un misterio hasta que en 1942 se logró elucidar por difracción de rayos X la estructura de las α - y β -CD y en 1948 la de la γ -CD. Estas tres ciclodextrinas son las más comunes, aunque existen CD de tamaños mayores como la δ -CD y la ϵ -CD que carecen de importancia. Una de las propiedades más significativas de las α -, β - y γ -CD es la posibilidad de formar complejos de inclusión con diversas moléculas orgánicas, lo que les ha dado una amplia gama de aplicaciones especialmente en la industria farmacéutica^[42,43] y de alimentos^[40,43] debido a su nula toxicidad y a la posibilidad de aumentar la solubilidad de ciertos medicamentos.

Estructuralmente las ciclodextrinas tienen la apariencia de conos truncados (Figura 15), donde la parte exterior es de carácter hidrofílico debido a que los grupos hidroxilo que conforman a las glucopiranosas se encuentran dispuestos al exterior, mientras que el

interior de estas cavidades es de carácter hidrofóbico, lo que les permite la inclusión en su interior de compuestos orgánicos apolares o parcialmente polares, como es el caso de los derivados del ácido cinámico^[44] y muchos otros compuestos orgánicos.

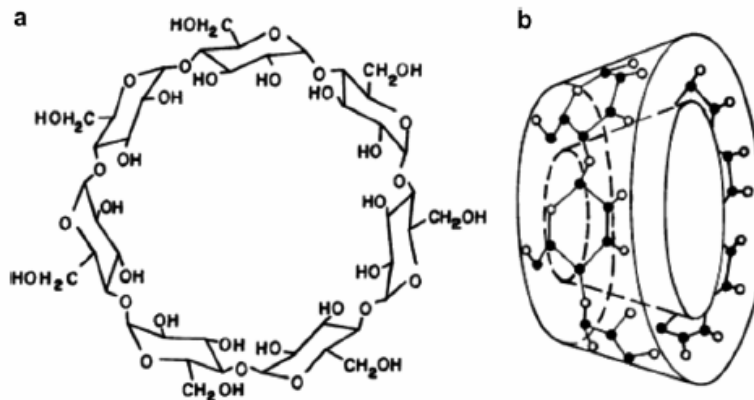


Figura 15. Tomada de [42] Estructura en forma de cono truncado de las CD, en este caso se representa la β -CD

Como ya se mencionó, las CD más empleadas para la formación de complejos son las α -, β -, y γ -CD que son los oligómeros de 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa respectivamente. Físicamente las CD son compuestos en forma de polvos blancos e higroscópicos y altamente solubles en agua, a excepción de la β -CD, la que por razones estructurales posee una solubilidad menor a la de sus análogos de 6 y 8 unidades. La solubilidad de las CD depende en gran medida de la temperatura y puede determinarse de manera teórica de acuerdo a las ecuaciones (41) a (43)^[38].

$$C_{\alpha\text{-CD}} = 112.71e^{-3530\left[\left(\frac{1}{T}\right) - \left(\frac{1}{298.1}\right)\right]} \quad (41)$$

$$C_{\beta\text{-CD}} = 18.2336e^{-14.137\left[\left(\frac{1}{T}\right) - \left(\frac{1}{298.1}\right)\right]} \quad (42)$$

$$C_{\gamma\text{-CD}} = (219.4 + / - 9.8)e^{(-3187 + / - 320)\left[\left(\frac{1}{T}\right) - \left(\frac{1}{298.1}\right)\right]} \quad (43)$$

Donde C queda expresada en mg/mL y T se expresa en K.

Las principales propiedades físicas de las CD se encuentran resumidas en la (Tabla 3).

Tabla 3. Principales propiedades físicas de las CD.

Propiedades	Ciclodextrinas.		
	α	β	γ
Unidades de glucopiranososa	6	7	8
Masa molar (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7 - 5.3	6.0 - 6.5	7.5 - 8.3
Temperatura de descomposición (°C)	250 - 260	255 - 265	240 - 245
Solubilidad en agua (g/100 ml H ₂ O a 25 °c)	14.50	1.85	23.20
Solubilidad en agua (mM)	149.02	16.30	178.87
Rotación de la luz polarizada	150	162.5	177.4
Profundidad de la cavidad (Å)	7.9	7.9	7.9
Diámetro de la periferia (Å)	14.6	15.2	17.5
Volumen aproximado de la cavidad de la periferia por molécula (Å ³)	174	262	972
Volumen aproximado de la cavidad de la periferia por gramo (Å ³)	0.10	0.14	0.20
Moléculas de H ₂ O en la cavidad	8	11	17

Con respecto a estas propiedades la hidrólisis de estos compuestos sigue el siguiente orden: α - < β - < γ - < δ -, aunque debe mencionarse que es difícil que estos procesos ocurran por que las CD son muy estables en amplios intervalos de pH.

3.9 Formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y moléculas orgánicas^[38,39].

Las CD se pueden considerar como cápsulas que pueden incluir una gran cantidad de moléculas en su cavidad hidrofóbica creándose de esta manera una interacción no covalente entre el huésped y la CD. La formación de complejos en disolución es un proceso que se encuentra en un equilibrio dinámico, donde la velocidad de la reacción directa, se iguala a la velocidad de la reacción inversa, ecuación (44):



Donde G es la molécula huésped y CD-G es el complejo de inclusión y la estabilidad de este complejo está descrita en términos de la constante de formación (K_f) o de su constante de disociación (K_d). El fenómeno de inclusión consiste básicamente en la sustitución de las moléculas de H_2O que se encuentran en el interior de la CD por un huésped menos polar. Este proceso es energéticamente favorable debido a la formación de interacciones entre el huésped y la cavidad. En este tipo de procesos la entalpía y la entropía tienen un papel de gran importancia.

El fenómeno de complejación se produce debido a la unión de varios efectos:

- a) Sustitución de las interacciones apolares-polares de las moléculas de H_2O por las del sustrato con la cavidad hidrofóbica de la CD y formación de las nuevas interacciones tipo van der Waals
- b) Liberación de la tensión del anillo durante la complejación.
- c) La estabilización energética por solvatación. La hidratación del complejo es más favorable que la de los componentes individuales.

Los parámetros termodinámicos como ΔS , y ΔH pueden obtenerse a partir de la dependencia de las constantes de disociación con la temperatura, o bien, pueden determinarse de manera más exacta por métodos termogravimétricos^[45,46] y también mediante la dependencia de la temperatura sobre la K_f .

Otros factores de importancia en la formación de complejos de inclusión con CD son la compatibilidad geométrica de la molécula huésped, si el huésped no tiene el tamaño adecuado no se ajustará dentro de la cavidad de la ciclodextrina, la polaridad y carga del huésped. La estabilidad de los complejos de inclusión está en función del carácter hidrófobo del sustrato, moléculas altamente hidrofílicas no formarían complejos de inclusión con CD y si los formaran la interacción sería muy débil. También la temperatura y el disolvente juegan un papel importante.

Capítulo 4.**Parte Experimental.****4.1 Reactivos.**

En la presente tesis se trabajó con tres compuestos *o*-difenólicos presentes en diversas frutas y verduras de manera natural (Figura 16). El ácido protocatecuico, APTC (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, No. CAS 99-50-3, 154.12 g/mol) y el ácido cafeico, ACAF (ácido 3,4-dihydroxicinámico, No. CAS 331-395, 180.16 g/mol) fueron de Sigma-Aldrich. El ácido clorogénico, ACGN (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexano carboxílico 3-(3,4-dihydroxicinamato, No. CAS 6001-76-9, 363.32 g/mol) se obtuvo de Fluka. En todos los casos la pureza de las sustancias se comprobó por cromatografía en capa fina (cromatoplasacas en gel de sílice 60 F 254, marca Aldrich) utilizando diversas proporciones de hexano y acetato de etilo como eluyentes.

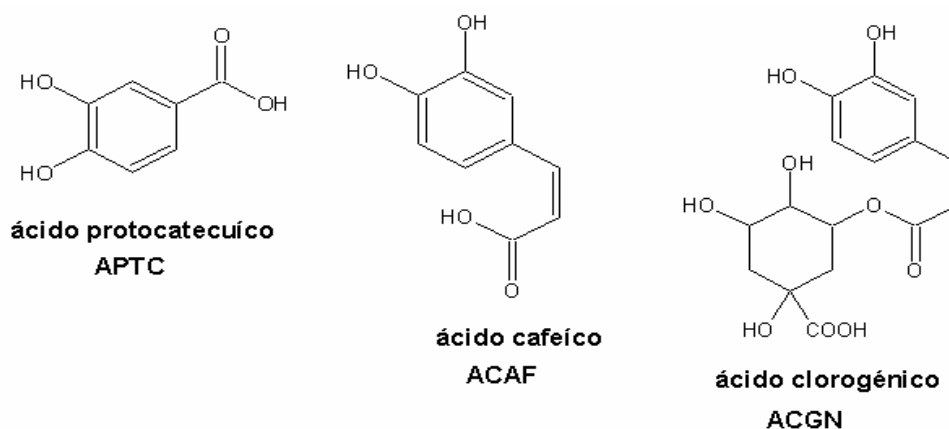


Figura 16. Estructura química, nombre y clave de los compuestos *o*-difenólicos estudiados.

Se emplearon también ferrocenometanol, FCM (No. CAS 1273-86-5, 216.07 g/mol), α -ciclodextrina, α -CD, (No.CAS 10016-20-3, 972.84 g/mol) y β -ciclodextrina, β -CD (No CAS 7585-39-3, 1134.98 g/mol) de Sigma-Aldrich . En todas las determinaciones se usó KCl (Sigma-Aldrich, No. CAS 7447-40-7, 74.55 g/mol) en una concentración 1 M como electrolito soporte. Para el burbujeo de las soluciones se utilizó nitrógeno de alta pureza(99.999 %) marca Infra.

Todos los reactivos empleados en este trabajo se pesaron con exactitud en una balanza marca Scaltec © modelo SBC 21 que permite pesar con precisión hasta décimas de miligramo.

4.2 Equipo y materiales empleados.

Los experimentos de voltamperometría cíclica, así como los experimentos de electrólisis a potencial controlado, se realizaron en un potenciostato Autolab© modelo PGSTAT 100, acoplado a un ordenador conteniendo el software GPES©, el que permitió el almacenamiento, la visualización y el análisis de los datos obtenidos.

Para la técnica de voltamperometría cíclica, se trabajó en una celda encaquetada de aproximadamente 15 mL (Figura 17) con el habitual arreglo de 3 electrodos. En todos los experimentos la temperatura de la disolución dentro de la celda se mantuvo constante a 25°C, utilizando un recirculador de marca Termo Scientific © modelo Nestlab RTE 7

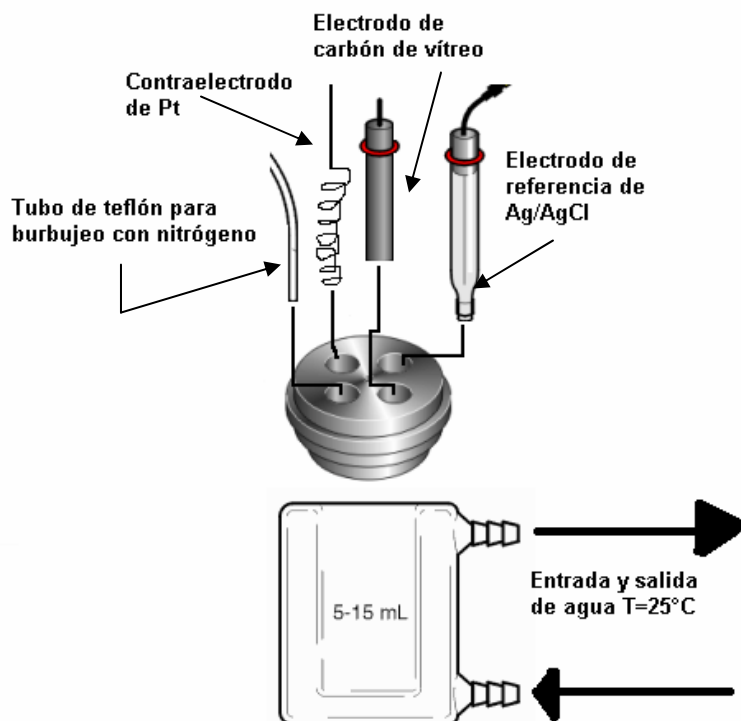


Figura 17. Esquema de la celda empleada para los experimentos de voltamperometría cíclica.

Todos los electrodos empleados en este trabajo son marca BAS (Figura 18), el electrodo de trabajo fue un electrodo de carbón vítreo de $0,06865 \text{ cm}^2$ de superficie, el de referencia fue de Ag/AgCl, en una solución acuosa de KCl 3 M. Finalmente, como contraelectrodo se utilizó un alambre de Pt, enrollado apropiadamente a fin de incrementar su superficie.

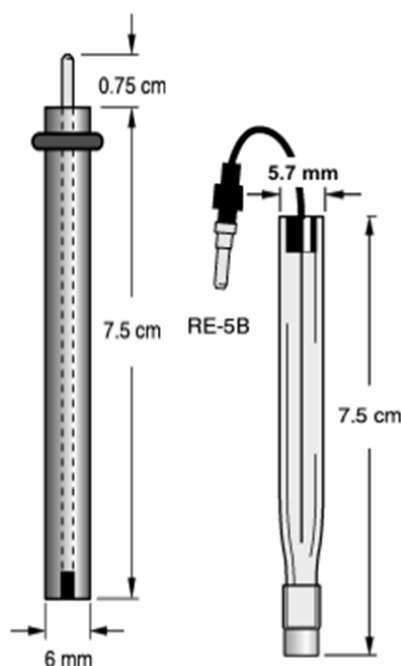


Figura 18. Especificaciones de los electrodos empleados en este trabajo. Electrodo de carbón vítreo (izquierda), electrodo de referencia Ag/AgCl (derecha). El electrodo de carbón vítreo se encuentra recubierto por una capa de baquelita que contiene un alambre de Cu como conexión al disco de carbón. El electrodo de referencia contiene un alambre de Ag recubierto por AgCl en una cápsula de vidrio conteniendo una disolución de KCl 3.0 M, el extremo inferior consiste de un trozo de vidrio poroso (Vycor ©).

La celda empleada en los experimentos de electrólisis a potencial controlado tiene una capacidad aproximada de 100 mL. Al igual que en la voltamperometría se tiene un arreglo de tres electrodos, sólo que en esta ocasión el electrodo de trabajo consistió en una malla de carbón de gran área superficial, aproximadamente 3.5 cm de diámetro y 5 cm de altura. Esto se hace con el fin de garantizar que todas las moléculas en disolución se transformen al producto de oxidación. El contraelectrodo, un alambre de Pt, se encontraba aislado físicamente de la disolución del analito mediante un tubo de Luggin (Figura 19), conteniendo una disolución de KCl 1.0 M. Durante la realización del experimento el sistema se mantuvo bajo agitación magnética.

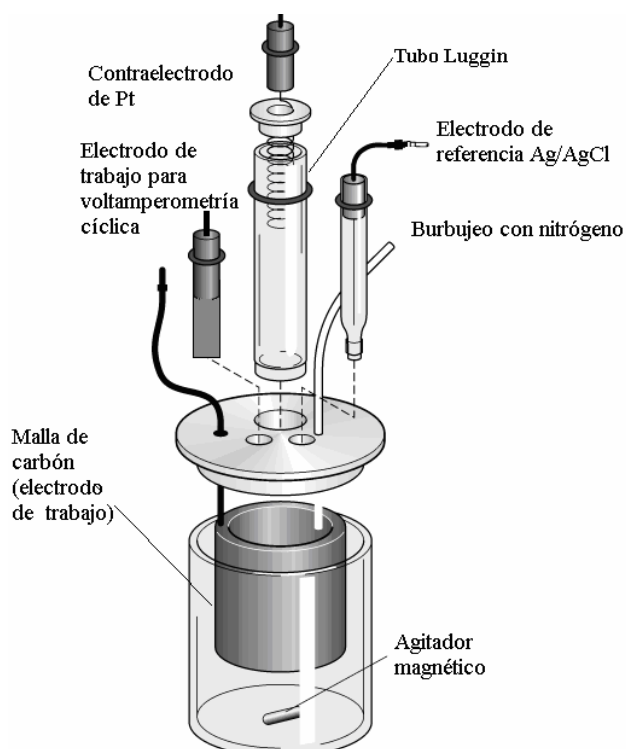


Figura 19. Diagrama de la celda empleada para los experimentos de electrólisis a potencial constante.

Entre cada determinación, el electrodo de trabajo se pulió cuidadosamente con alúmina marca Leco © con tamaño de partícula de $0.05\ \mu\text{m}$, el exceso de alúmina se eliminó con agua destilada y sonicación por 30 segundos (Cole Parmer © modelo 8891). Finalmente, antes de introducir el electrodo en la celda, éste se limpió con acetona (J.T Baker ©). Entre cada analito estudiado, el electrodo de trabajo se pulía con suspensiones de alúmina marca Büehler © de 5.0 , 1.0 y $0.3\ \mu\text{m}$, finalizando con el pulido convencional con alúmina de $0.05\ \mu\text{m}$ y acetona. Para obtener mayor reproducibilidad en las determinaciones, previo al estudio del analito, el electrodo de trabajo se sumergió en la disolución burbujeada del electrolito soporte y se realizaron 30 ciclos de potencial, barriendo en el intervalo de -0.2 a $0.9\ \text{V}$ a una velocidad de barrido de $0.1\ \text{V/s}$.

Para los experimentos de voltamperometría cíclica y de electrólisis a potencial controlado se mantuvo en todo momento atmósfera de nitrógeno, esto con el fin de mantener libre de oxígeno la disolución bajo estudio y en el caso de la electrólisis a potencial controlado contribuir con agitación mecánica al sistema.

Todas las simulaciones digitales se realizaron con el software de simulación digital de experimentos electroquímicos DigiElch^[47] versión 4.0 (<http://www.elchsoft.com>) . La optimización de la geometría molecular se realizó con el programa Spartan'06^[50] proporcionado por Wavefunction Inc (www.wavefun.com).

4.3 Procedimiento.

4.3.1 Calibración del área efectiva del electrodo de trabajo y determinación de la resistencia no compensada, R_u .

Se realizó un estudio de velocidades de barrido para el sistema de ferrocenometanol (FCM) en KCl 1.0 M, con el conjunto de electrodos referidos en la sección de materiales y equipo. Las velocidades empleadas fueron de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 V/s y se trabajó con tres concentraciones del FCM: 0.5, 1 y 1.5 mM, empleando en cada caso 10 mL de disolución, burbujeada por 45 minutos con nitrógeno de alta pureza. Para cada velocidad se registraron los voltamperogramas por duplicado, empezando de las velocidades más bajas a las más altas y regresando a la de 1.0 y 0.1 V/s para verificar la reproducibilidad del proceso. Posteriormente, se registraron para cada velocidad de barrido, los voltamperogramas cíclicos del medio electrolítico en ausencia del analito, éstos se restaron al voltamperograma cíclico del analito, corrigiendo así la contribución de la corriente debida al cargado de la doble capa en el sistema electrolítico. Durante el experimento no se aplicó ninguna compensación electrónica, por lo que el valor de la resistencia no compensada y el área real del electrodo de trabajo se determinaron por simulación digital de voltamperogramas cíclicos de FCM, utilizando el coeficiente de difusión, D , y la constante de velocidad heterogénea, k° , reportados en la literatura para este compuesto^[49], aunque cabe señalar que durante el experimento no se hizo corrección electrónica de la caída ohmica, el total de la resistencia no compensada se aplicó durante la simulación. Para la titulación con CD se utilizaron los voltamperogramas cíclicos a 0.1 V/s, en donde la contribución de la caída óhmica es mínima.

4.3.2 Electrólisis a potencial controlado para los compuestos *o*-difenólicos^[50-52].

Se prepararon 50 mL de las disoluciones de cada ácido de tal forma que se tuviera una concentración aproximada de 1.0 mM (aunque en este caso la medición depende no de la concentración sino de la cantidad de masa electrolizada). Para facilitar la solubilización de los analitos, las soluciones de ACGN y APTC se sometieron a 3 minutos de sonicación, mientras que en el caso del ACAF dada su baja solubilidad en agua fueron necesarios 35 minutos. Previo a la electrólisis, todas las soluciones se burbujearon con N₂ durante aproximadamente 50 min. Con el microelectrodo de carbón vítreo debidamente pulido se registró un voltamperograma inicial de la disolución para elegir el potencial al que se llevará a cabo la electrólisis, en este caso el potencial de oxidación se situó alrededor de 0.7 V para los tres compuestos bajo estudio. Este valor corresponde al potencial donde el transporte de masa se encuentra limitado por la difusión, pero no lo suficientemente alejado del pico anódico como para causar una sobreoxidación. Una vez determinado el potencial de electrólisis, se hizo la conexión al electrodo de malla de carbón y se inició el experimento manteniendo el valor del potencial constante hasta que todo el analito en disolución ha sido oxidado. El fin del experimento de electrólisis se determinó cuando la carga no cambió en función del tiempo^[53]. Dado que en este experimento se requiere que todas las moléculas del analito en disolución sean oxidadas, la disolución a electrolizar se mantuvo bajo agitación magnética y burbujeo de nitrógeno durante todo el experimento.

Cada experimento se realizó por duplicado y la contribución del medio de reacción a la carga total, se evaluó mediante un experimento de electrólisis del medio electrolítico sin el analito, los resultados mostraron que dicha contribución es insignificante, así el valor de carga total se determinó directamente a partir de la gráfica de carga (Q) vs. tiempo (t). Al terminar la electrólisis se registró el voltamperograma de la disolución electrolizada.

4.3.3 Determinación del comportamiento electroquímico de los compuestos *o*-difenólicos en ausencia de CD.

Se siguió el procedimiento descrito para el ferrocenometanol, trabajando cada compuesto a dos concentraciones diferentes: aproximadamente 0.5 y 1.0 mM para

ACAF y 1.0 y 2.0 mM para ACGN y APTC. Las condiciones de sonicación fueron las mismas que en el caso de la electrólisis a potencial controlado y se realizó el mismo registro de velocidades de barrido que para FCM, corrigiendo en todos los casos la contribución del medio electrolítico.

Los voltamperogramas cíclicos de todos los compuestos se obtuvieron midiendo la corriente (i) en el electrodo de trabajo como una función del potencial (E vs. $Ag/AgCl$). En todos los voltamperogramas cíclicos las corrientes negativas muestran la presencia de reacciones de oxidación, mientras que las corrientes positivas corresponden a reacciones de reducción.

4.3.4 Determinación del comportamiento electroquímico de los compuestos *o*-difenólicos en presencia de CD.

En cuanto a la preparación y solubilización de los compuestos *o*-difenólicos se siguió el mismo procedimiento que en los casos anteriores. Para este estudio los voltamperogramas se registraron a velocidad constante de 0.1 V/s. En el caso de la α -CD, dada su alta solubilidad (14.5 g / 100 mL) fue posible la preparación de una disolución stock de concentración aproximada 0.1 M. Utilizando una micropipeta (Eppendorf © de 20 a 100 μ L) se adicionaron alícuotas de 50 μ L de la disolución stock de CD, hasta obtener un total de 10 concentraciones crecientes. Entre cada adición de CD, la disolución se mantuvo durante 30 segundos bajo agitación magnética y burbujeo con nitrógeno para su homogeneización. Los voltamperogramas cíclicos para cada concentración de CD se registraron por duplicado.

Para los cálculos de la concentración total de CD se incluyó el efecto de la dilución debida a los diferentes volúmenes de disolución stock añadido. Cabe señalar que la concentración del analito no se modificó durante la titulación con CD, debido a que la disolución stock de ésta se aforó con la disolución del compuesto *o*-difenólico y del electrolito soporte, ambos en la misma concentración que en la celda electroquímica.

En el caso de la β -CD, debido a su baja solubilidad (1.85 g / 100 mL) (Tabla 3), no fue posible preparar una disolución stock, por lo que para la preparación de las

disoluciones conteniendo diferentes concentraciones de β -CD, ésta se adicionó directamente en estado sólido. La concentración de β -CD utilizada comprende el intervalo de 1.0 mM a 10.0 mM aproximadamente. Después de cada adición, las soluciones se agitaron mecánicamente durante aproximadamente 60 segundos bajo atmósfera de nitrógeno y se registraron los voltamperogramas correspondientes.

En estos estudios los valores de corriente anódica y catódica, así como sus potenciales correspondientes se obtuvieron mediante la función de máximos y mínimos con la que cuenta el GPES© , estas determinaciones se realizaron sobre los voltamperogramas corregidos.

Capítulo 5.**Resultados y discusión.**

El interés fundamental de este trabajo de tesis fue caracterizar los complejos de inclusión entre α - y β -CD y tres compuestos *o*-difenólicos, los ácidos protocatecuico (APTC), clorogénico (ACGN) y cafeico (ACAF), que son compuestos muy abundantes en diferentes frutas y verduras. Se propone que al estar un compuesto *o*-difenólico en el interior de la cavidad de una CD, la enzima PPO no sería capaz de oxidarlo y de esta manera se evitaría o retardaría el oscurecimiento enzimático.

Para tal propósito se inició la caracterización del comportamiento voltamperométrico de los *o*-difenoles en medio acuoso y el estudio del mecanismo de oxidación mediante simulación digital de los voltamperogramas experimentales. Así, fue necesario realizar primero la calibración del área del electrodo de trabajo, así como la determinación de la caída óhmica, ya que estos parámetros son necesarios en la simulación de los voltamperogramas. Para apoyar el mecanismo propuesto, se obtuvo el número de electrones intercambiados en el proceso de oxidación mediante experimentos de electrólisis a potencial controlado. Una vez que se determinó el mecanismo de oxidación, se estudió el comportamiento voltamperométrico para los tres compuestos de interés, en presencia de concentraciones crecientes de α - y β -CD. Los voltamperogramas cíclicos fueron entonces analizados empleando el modelo de Evans y *col.* para obtener las constantes de formación K_f de los complejos de inclusión.

La última parte de este trabajo se centra en la discusión y comparación de otros valores de K_f , reportados en la literatura, obtenidos por otras técnicas con los valores obtenidos en esta tesis. Además se presenta información relevante de otros autores que sirve de apoyo a nuestra investigación.

5.1 Calibración del área efectiva del electrodo de trabajo y determinación de la resistencia no compensada.

La electroquímica al ser una ciencia interfacial depende en gran medida de la superficie disponible para que se lleve a cabo la reacción, por esto es de fundamental importancia conocer el valor exacto de área real del electrodo, esto es de gran utilidad especialmente

cuando se requiere obtener parámetros electroquímicos y cinéticos de manera cuantitativa, por ejemplo cuando se emplea la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales.

El área del electrodo de trabajo y el valor de la resistencia no compensada se determinaron mediante simulación digital de los voltamperogramas cíclicos de FCM obtenidos a diferentes velocidades de barrido (v) y concentraciones. El FCM se eligió debido a que presenta un sistema redox reversible, cuyas propiedades electroquímicas, como son el coeficiente de difusión, D , y la constante heterogénea de transferencia de electrones, k° , han sido perfectamente determinadas en medio acuoso^[49].

El proceso redox que tiene lugar para el FCM, es la transferencia de un electrón en el átomo de hierro, con estado de oxidación (Fe^{2+}), para formar un derivado del ión ferricinio, Fe^{3+} , reacción (45).



En las Figuras 20 y 21 se presentan los voltamperogramas cíclicos de FCM a diferentes velocidades de barrido y concentraciones, respectivamente. Como puede observarse la corriente de los picos voltamperométricos aumenta a medida que la velocidad de barrido y/o la concentración se incrementan. En el Anexo B, ecuación (117), se muestra que la dependencia entre la corriente y la velocidad de barrido es cuadrática, en tanto que en el caso de la concentración, la dependencia es directamente proporcional.

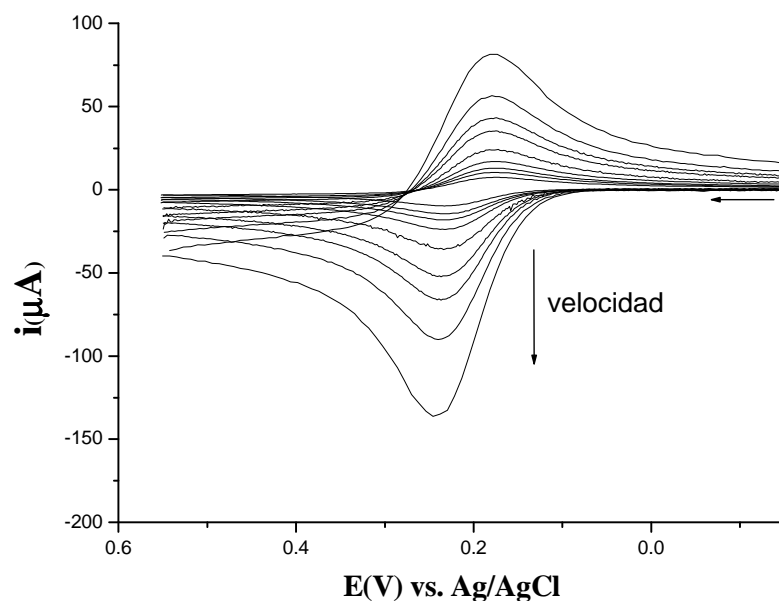


Figura 20. Voltamperogramas cíclicos de FCM 0.55 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.

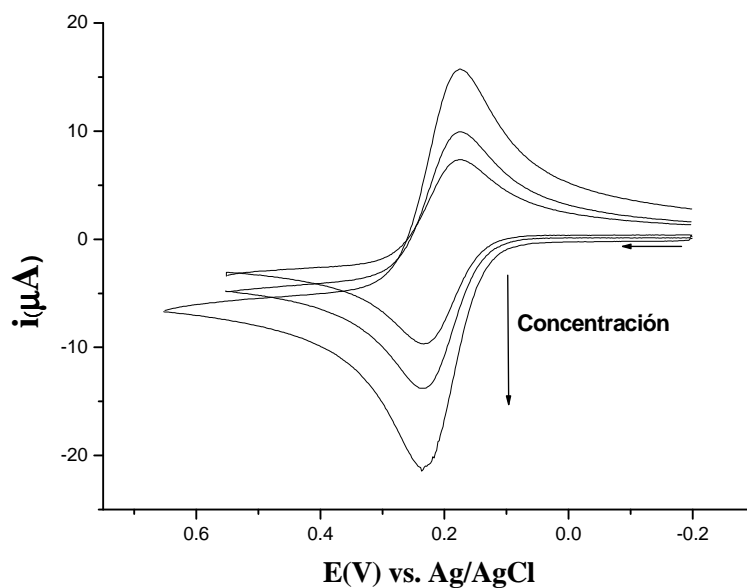


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de FCM 0.55, 1.07, y 1.63 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidad de barrido de 0.1 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo.

Es importante mencionar, que para cada concentración y velocidad de barrido estudiada, los experimentos se realizaron por duplicado, obteniéndose en todos los casos una reproducibilidad excelente. Una buena reproducibilidad es fundamental, para obtener un

buen ajuste entre los voltamperogramas teóricos calculados por simulación digital y los voltamperogramas experimentales. Adicionalmente a esto, queda manifiesto que no hay una contribución importante de fenómenos de adsorción del analito sobre la superficie del electrodo de trabajo bajo estas condiciones experimentales.

Para la simulación de los voltamperogramas cíclicos experimentales es necesario conocer la concentración y velocidad de barrido experimentales, el coeficiente de difusión (D) del FCM en el medio bajo estudio, el valor de la constante heterogénea de transferencia electrones (k°) y el área del electrodo (inicialmente se emplea el área nominal que indica el fabricante, que es de 0.07 cm^2) y el valor de la resistencia no compensada (R_u). Los valores del coeficiente de difusión ($7.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) y la k° (2.06 cm/s) utilizados en la simulación se obtuvieron de un trabajo previo de Bard y col^[49].

Dado que durante el experimento no se aplicó ninguna compensación electrónica, el valor de la resistencia no compensada se encontró por simulación digital de los voltamperogramas experimentales. Partiendo de que la magnitud de la k° se conoce con exactitud, lo que se hace en la simulación es fijar este valor (2.06 cm/s) e ir modificando la R_u , hasta encontrar el valor único de resistencia que ajusta bien para la separación de los potenciales observada en los voltamperogramas cíclicos experimentales de todas las concentraciones y velocidades de barrido estudiadas. Simultáneamente a la determinación de la R_u , se ajusta la posición del pico mediante la manipulación del valor del potencial de oxidación (E), en nuestro caso, el potencial que mejor explica la posición de los picos en todos los voltamperogramas experimentales es 0.215 V . Así, fue posible determinar un valor de $R_u = 20 \Omega$, que corresponde al medio acuoso de KCl 1.0 M y para el arreglo particular de la celda electroquímica empleada.

Una vez ajustada la posición y la separación de los picos voltamperométricos, se hace un ajuste mas fino, en el que se busca la mejor concordancia en la corriente de los picos voltamperométricos, este ajuste se logra mediante la modificación del coeficiente de difusión (el que inicialmente se fijó en el valor teórico).

La magnitud de la variación entre el coeficiente de difusión obtenido por simulación y el valor experimental está relacionada con el área efectiva del electrodo de trabajo mediante la ecuación (46). Por esto, es importante que para las diferentes

concentraciones de FCM se obtengan valores de coeficiente de difusión reproducibles, dentro de un error experimental no mayor al 5%.

$$A_2 = \frac{D_1^{1/2} A_1}{D_2^{1/2}} \quad (46)$$

Donde A_2 es el área efectiva del electrodo empleado, A_1 es el área nominal del electrodo reportada por el fabricante y D_1 es el coeficiente de difusión teórico^[49]. El coeficiente de difusión encontrado por simulación es 8.11×10^{-6} cm/s, lo que lleva a un valor de área efectiva de $A_2 = 0.06865$ cm².

Para la aplicación de este procedimiento, las velocidades de barrido deben seleccionarse en un intervalo tan amplio como sea posible, en nuestro caso el intervalo estudiado fue de 0.1 a 10.0 V/s y las concentraciones deben comprender el intervalo de concentraciones en el que se estudiarán los analitos de interés.

En las Figuras 22 y 23 se presentan algunos ejemplos representativos del ajuste obtenido entre los voltamperogramas cíclicos simulados y los experimentales. Es importante mencionar, que la misma serie de parámetros se utilizó para todas las concentraciones y velocidades de barrido estudiadas. Como se observa, el ajuste obtenido en todos los casos es muy bueno, y los resultados obtenidos son congruentes, ya que el área obtenida no está muy alejada del valor esperado y con respecto a la compensación de la resistencia, se obtiene un valor pequeño, tal y como se espera para un medio altamente conductor como es el KCl en alta concentración 1.0 M.

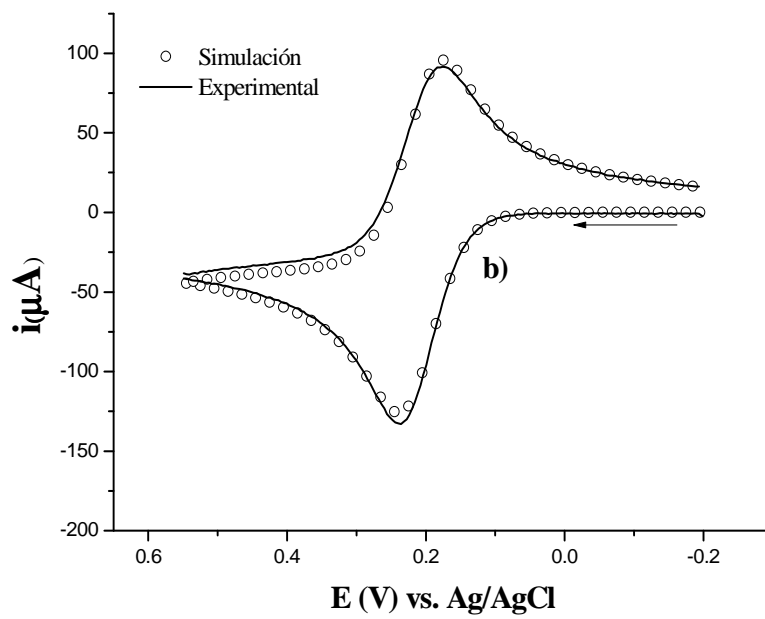
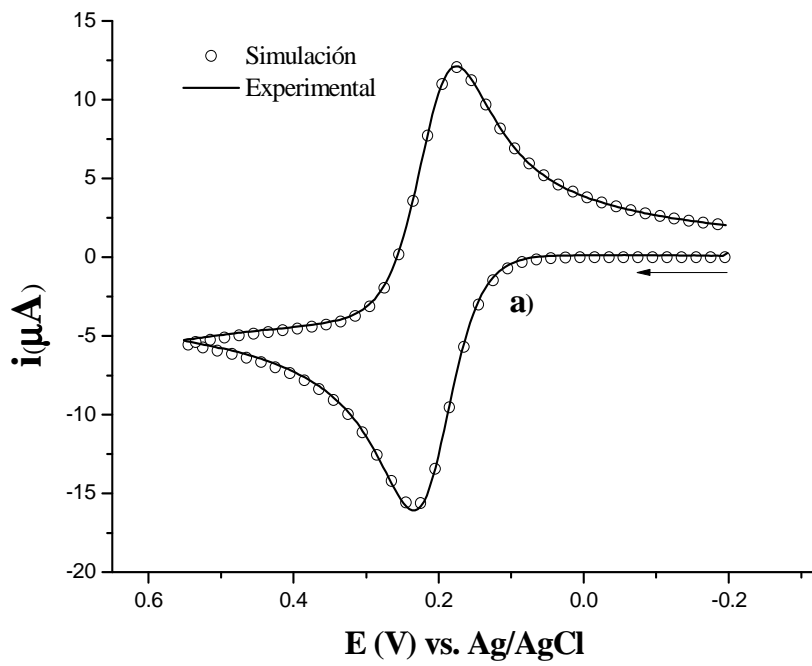


Figura 22. Comparación entre los voltamperogramas teóricos (símbolos) y experimentales (línea continua) de FCM 1.63 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido: a) 0.1V/s b) 5.0 V/s. Electrodo de trabajo C vítreo.

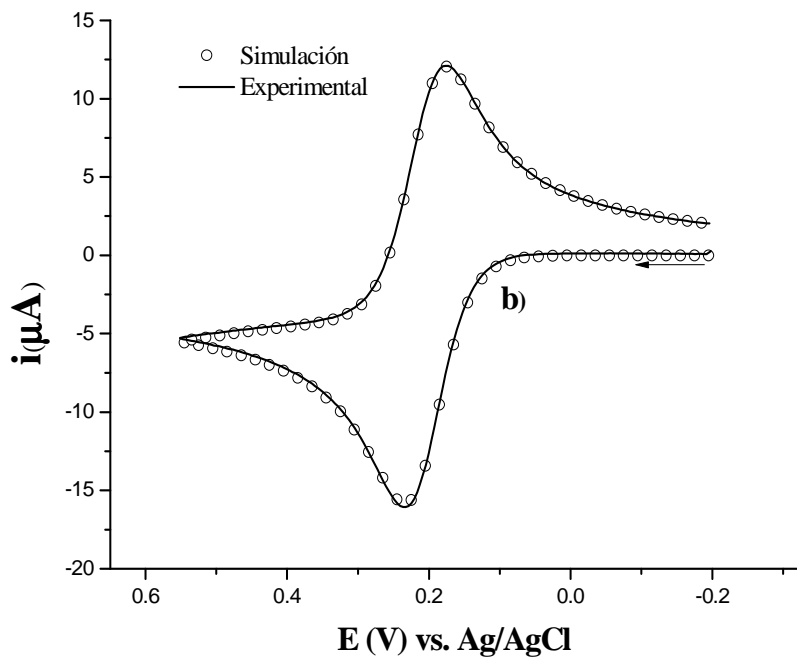
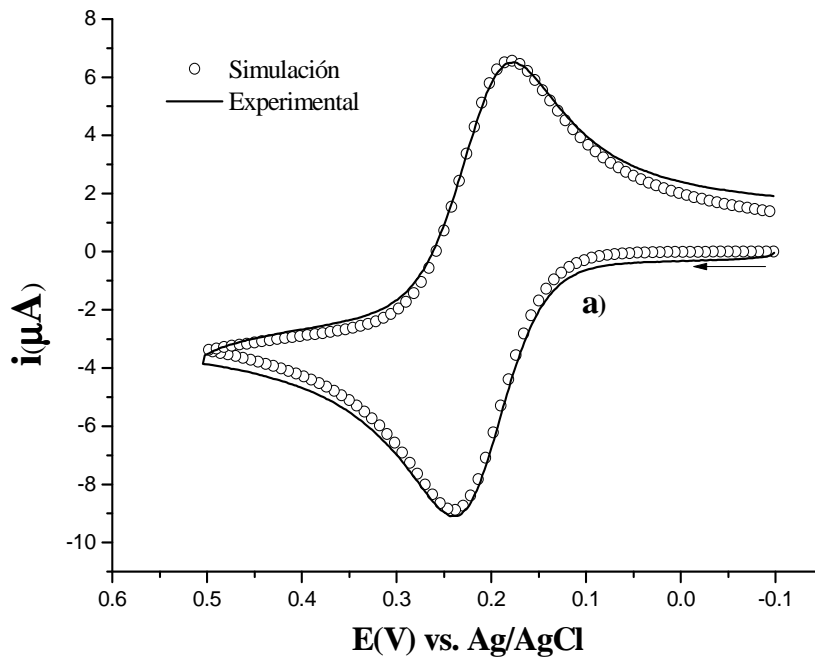


Figura 23. Comparación entre los voltamperogramas teóricos (símbolos) y experimentales (línea continua) de FCM: a) 0.5 mM y b) 1.0 mM en KCl 1.0 M a 25 °C a una velocidad de barrido de 0.1 V/s Electrodo de trabajo C vítreo.

5.2 Estudio electroquímico de los compuestos o-difenólicos en medio acuoso.

5.2.1. Voltamperometría cíclica

Ejemplos representativos de los voltamperogramas cíclicos obtenidos a diferentes velocidades de barrido para los ácidos protocatecuico (APTC), cafeico (ACAF) y clorogénico (ACGN) (Estructuras en la figura 16) en disolución acuosa de KCl 1.0 M a 25 °C se muestran en las Figuras 24 - 26.

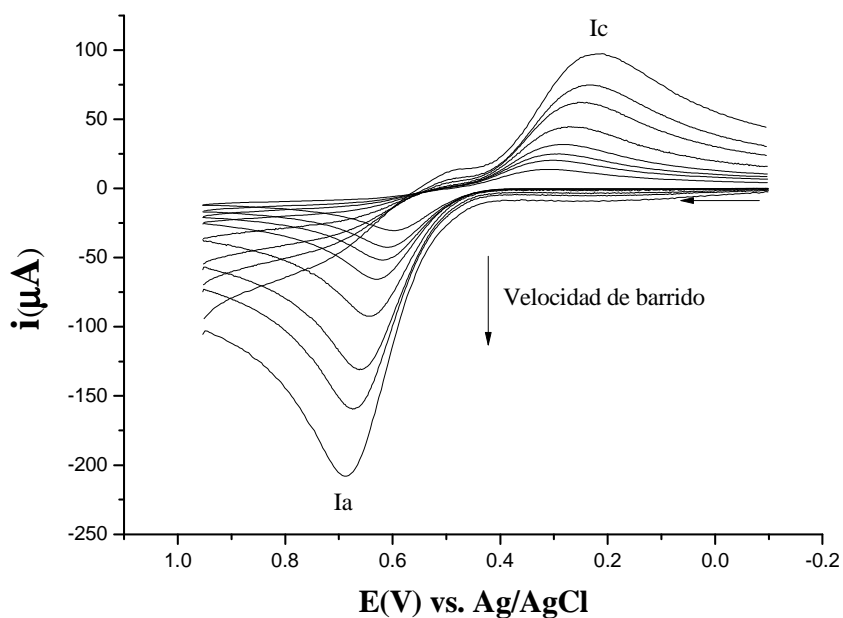


Figura 24. Voltamperogramas cíclicos de APTC 1.09 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 V/s. Electrodo de trabajo C vítreo.

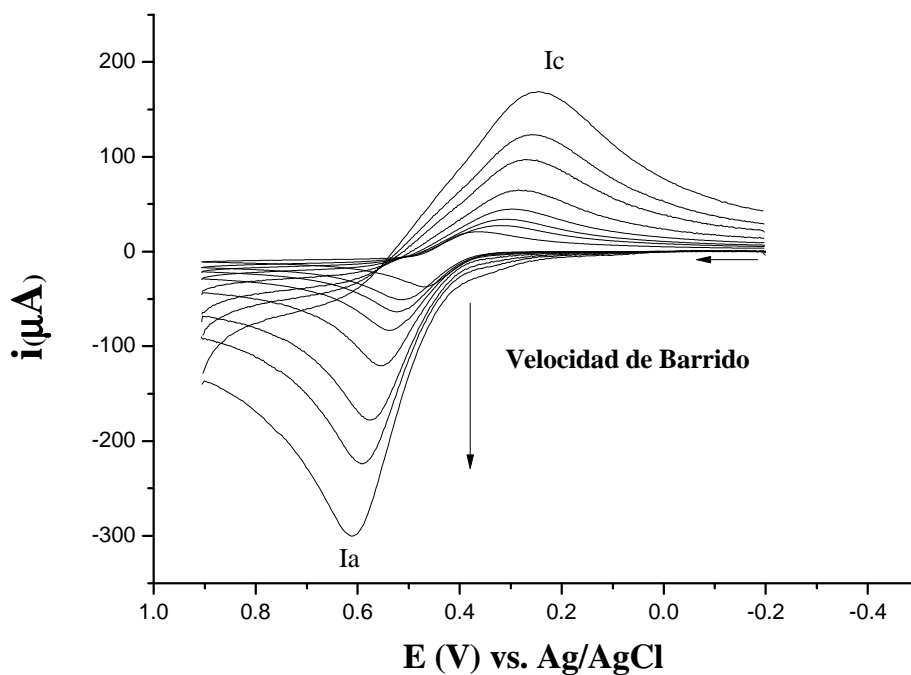


Figura 25. Voltamperogramas cíclicos de ACAF 1.15 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 V/s. Electrodo de trabajo C vítreo.

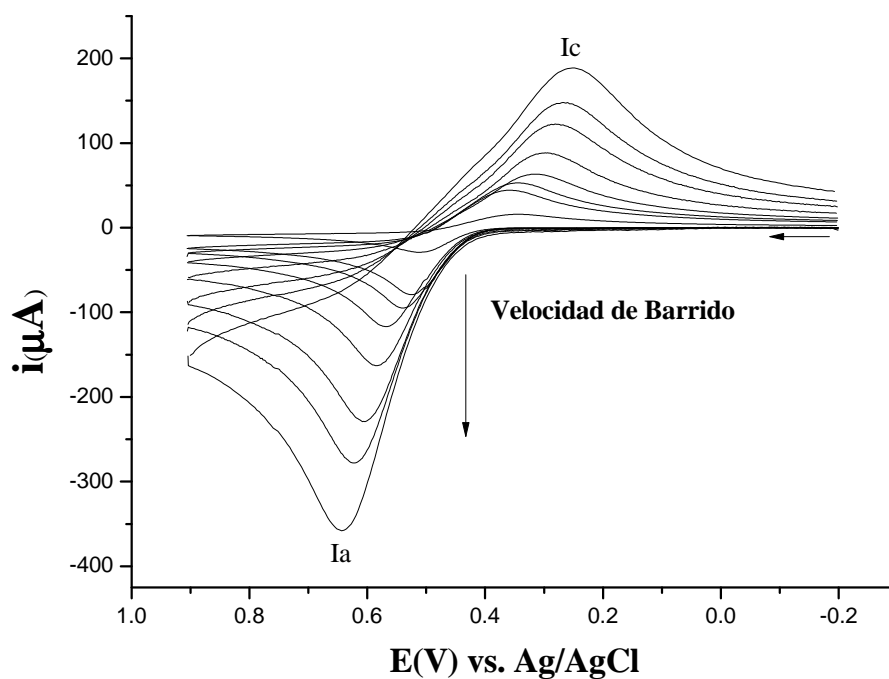


Figura 26. Voltamperogramas cíclicos de ACGN 1.99 mM en KCl 1.0 M a 25 °C y velocidades de barrido de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3 y 5 V/s. Electrodo de trabajo C vítreo.

En las figuras anteriores se observa que los tres compuestos presentan un pico anódico (Ia) asociado a un pico catódico (Ic), de la misma forma que se obtuvo para el FCM, excepto que para estos compuestos, la separación entre ambos picos ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) es mayor (Tabla 4), observándose el mismo comportamiento para las diferentes velocidades de barrido estudiadas. La forma de los voltamperogramas cíclicos sugiere que en el pico Ia el compuesto catecólico, la *o*-hidroquinona, se oxida a la correspondiente *o*-benzoquinona, en un proceso involucrando dos electrones y dos protones, pasando por la formación de la semiquinona (reacción (47)). La reacción opuesta, es decir la reducción de la *o*-quinona a la *o*-hidroquinona ocurre durante el barrido inverso^[54] al potencial del pico Ic (inverso de la reacción (47)).

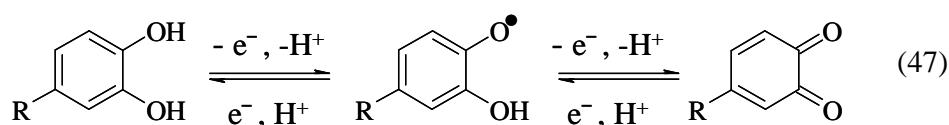


Tabla 4. Potenciales anódicos y catódicos de los compuestos *o*-difenólicos en medio acuoso de KCl 1.0 M obtenidos a 0.1 V/s.

Compuesto	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)
APTC	0.561	0.352	0.209
ACAF	0.486	0.295	0.191
ACGN	0.529	0.334	0.195
FCM	0.233	0.175	0.058

Los potenciales de oxidación en la Tabla 4 muestran que los compuestos derivados del ácido cinámico (ACAF y ACGN) presentan una mayor tendencia a la oxidación que el derivado del ácido benzoico (APTC). A pesar de que el potencial de oxidación no se relaciona directamente con la capacidad antioxidante de algún compuesto en específico^[3,15], se ha observado que los derivados del ácido cinámico presentan una mayor actividad antioxidante que los derivados del ácido benzoico. En el caso del ACAF y el ACGN el potencial de oxidación que se observa es menor para el primero de los compuestos, sin embargo el ACGN, presenta una mayor actividad antioxidante.

El orden de oxidación entre los derivados del ácido cinámico y los derivados del ácido benzoico se explica debido a la formación de estructuras de resonancia más estables

debido al doble enlace presente en la estructura de los derivados del ácido cinámico, ya que si bien ambas clases de compuestos pueden presentar el fenómeno de resonancia, los derivados del ácido cinámico pueden estabilizar la deficiencia de carga en un mayor número de átomos, lo que se manifiesta en un menor requerimiento energético para la formación de la semiquinona radical. Un fenómeno interesante y que merece ser mencionado es la estabilización del radical de la semiquinona, vía un puente de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno radical y el grupo $-OH$ vecino (en el caso de los compuestos *o*-difenólicos esta distancia es cercana a los 3 Å) (Figura (27))^[3,54]

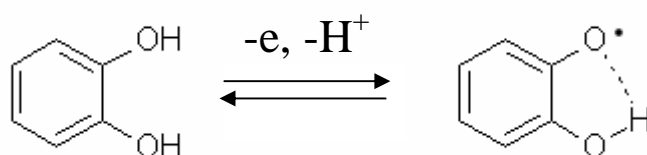


Figura 27. Estabilización a través de puente de hidrógeno intramolecular en el radical semiquinona de compuestos *o*-difenólicos.

Otra tendencia significativa, es el hecho que los coeficientes de difusión, dependen de la masa y volumen molecular de los compuestos en una forma inversa, es decir, a mayor volumen, menor coeficiente de difusión (Ver Anexo B). Es por esto que resulta interesante comparar los voltamperogramas cíclicos de los tres compuestos estudiados, graficando la corriente normalizada, i_N , (corriente/concentración del analito) vs. el potencial. Teóricamente, de acuerdo al volumen molecular de estos compuestos (Tabla 5), se esperaría la siguiente tendencia para la magnitud de la corriente: i_N APTC > i_N ACAF > i_N ACGN, que es justamente la tendencia que encontramos experimentalmente (Figura 28).

Tabla 5. Masas y volúmenes moleculares de los compuestos *o*-difenólicos calculadas mediante optimización de la geometría molecular con la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a nivel B3LYP 6-31G*

Compuesto	APTC	ACAF	ACGN
Masa atómica (uma)	154.121	180.159	354.311
Volumen molecular (Å ³)	141.02	173.64	322.86

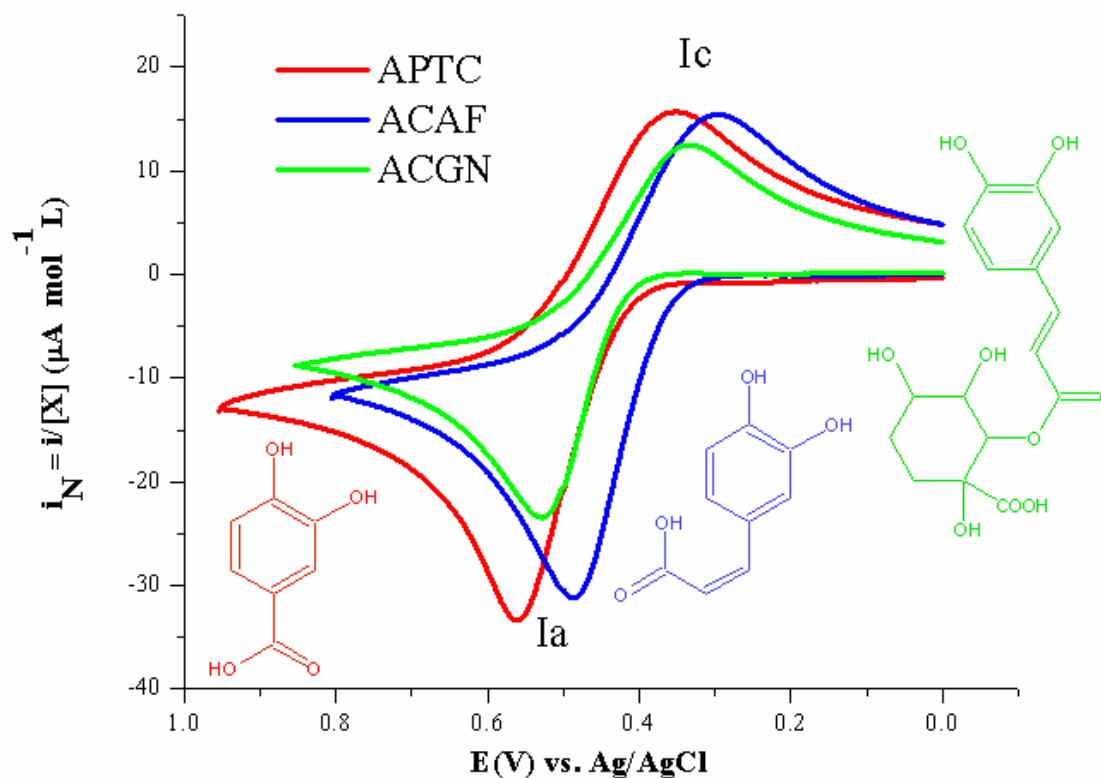


Figura 28. Voltamperogramas con corriente normalizada a la concentración para APTC (línea roja), ACAF (línea azul) y ACGN (línea verde) en KCl 1 M a 25 °C y 0.1V/s. Electrodo de trabajo C vítreo.

5.2.2 Electrólisis a potencial controlado.

Para confirmar que el pico anódico Ia corresponde a la transferencia de dos electrones para la oxidación de *o*-hidroxifenol a *o*-quinona, reacción (47), se realizó para los tres compuestos *o*-difenólicos la determinación del número de electrones por electrólisis a potencial controlado ^[50-52]. El potencial de electrólisis se fijó algunos mV después del pico de oxidación Ia (0.7 V para todos los compuestos) y se midió la carga en función del tiempo (Figura 29). La carga experimental total (Q) está relacionada con el número de electrones transferidos (*n*) y con el número de moles de especie oxidada (*N*_o), mediante la ley de Faraday, ecuación (48), en donde F es la constante de Faraday. (Ver Anexo B).

$$Q = nFN_o \quad (48)$$

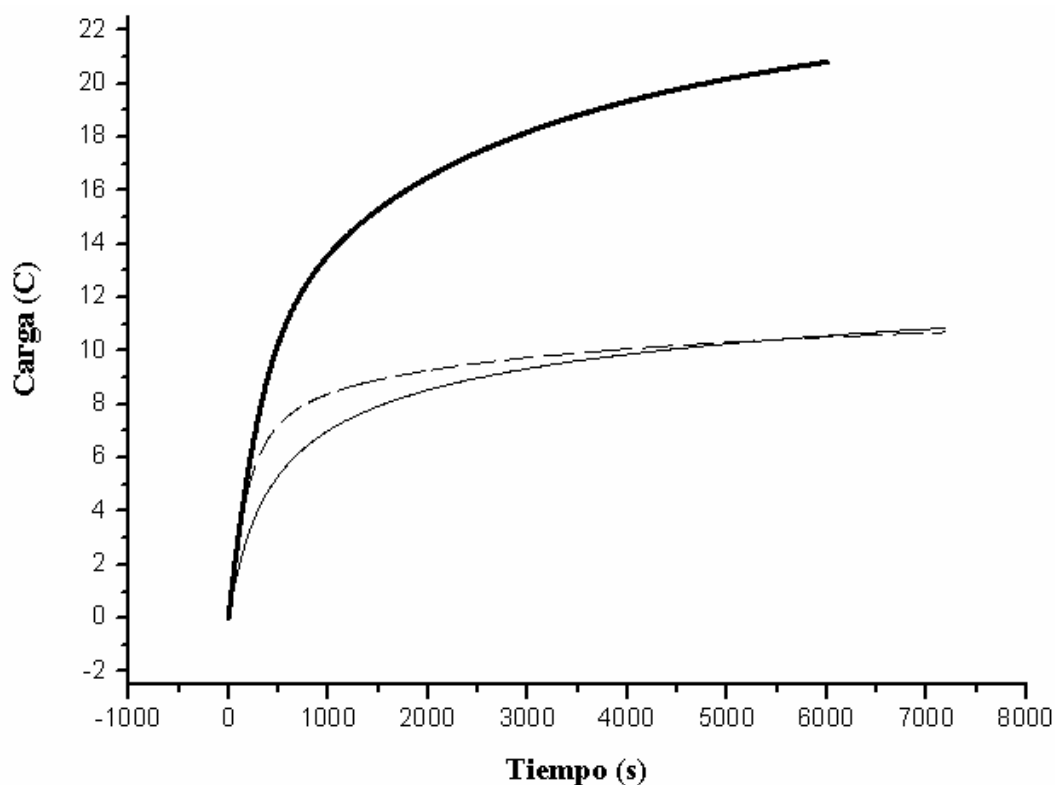


Figura 29. Curva carga vs. tiempo para la electrólisis a potencial controlado de 0.7 V vs. Ag/AgCl para: APTC 5.06×10^{-5} moles (línea continua y remarcada), ACAF 3.99×10^{-5} moles (línea discontinua) y ACGN 5.15×10^{-5} moles (línea delgada y continua) en KCl 1.0 M a temperatura ambiente.

Los valores experimentales de n (Tabla 6) muestran que el número de electrones obtenido por esta técnica no concuerda con los dos electrones esperados para el paso de *o*-hidroquinona a *o*-quinona. Esto se puede explicar debido a que la escala de tiempo del experimento de electrólisis (dos horas aproximadamente) es mucho mayor que la de la voltamperometría cíclica. Es bien sabido que las *o*-quinonas son especies reactivas, que fácilmente reaccionan con especies nucleofílicas vía reacciones de Michael, de tal manera que cualquier especie nucleofílica presente en el medio de reacción podría reaccionar con la *o*-quinona electrogenerada. En la Figura 30 se observa que el ataque nucleofílico causa la regeneración de la función catecol, de tal manera que el nuevo catecol, al potencial de la electrólisis se estaría también oxidando. Esto explicaría el hecho de que para APTC y ACAF se tenga un número de electrones mayor al esperado. Sin embargo, es muy posible que en el caso del ACGN la adición de especies nucleofílicas esté muy impedida debido a lo voluminoso del sustituyente en la posición 4- del catecol (Figura 16).

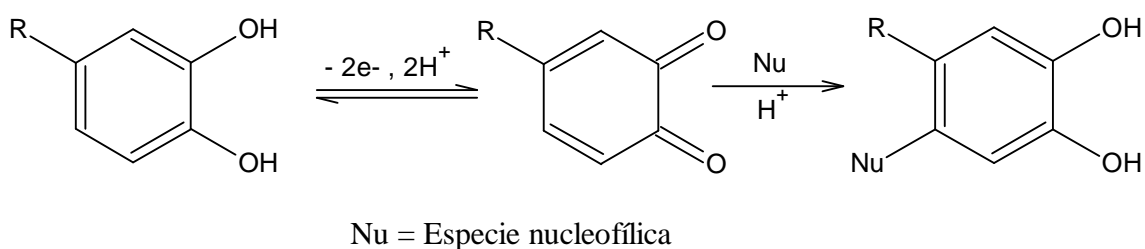


Figura 30. Reactividad de las *o*-quinonas electrogeneradas en presencia de nucleófilos, vía la reacción de adición de Michael.

Tabla 6. Número de electrones obtenidos por electrólisis a potencial controlado.

Compuesto	APTC	ACAF	ACGN
Electrones transferidos (<i>n</i>)	2.9	2.3	1.7

5.2.3 Investigación del mecanismo de oxidación mediante simulación digital.

La oxidación de compuestos catecólicos (*o*-hidroquinonas) a *o*-benzoquinonas y la reducción de quinonas a hidroquinonas son procesos inversos, de tal manera que el esquema cuadrado de reacciones propuesto para la reducción del sistema quinona a hidroquinona^[55] aplica también para el proceso inverso, de hidroquinona a benzoquinona (Figura 31).

La Figura 31 muestra que el proceso de oxidación puede seguir diferentes trayectorias, el que se siga una u otra ruta depende de las condiciones experimentales, incluyendo tanto el pH del medio de reacción, como la acidez y/o la basicidad de las especies involucradas, las que están directamente con la estructura molecular del compuesto *o*-difenólico.

En el caso particular de APTC con valores de *pKa* de: *pKa*₁ = 4.35 (grupo -COOH), *pKa*₂ = 8.79 y *pKa*₃ = 13.0 (grupos -OH fenólicos)^[56,57], es razonable asumir que bajo las condiciones experimentales, considerando que se trabajó en una disolución acuosa de KCl 1.0 M (pH = 6.8), los grupos -OH fenólicos no estarán disociados, por lo que cualquier trayectoria involucrando equilibrios ácido-base iniciales pueden descartarse. Así, de acuerdo con la Figura 31, deberá haber al menos tres diferentes trayectorias

posibles que expliquen el mecanismo de oxidación de *o*-hidroquinona a *o*-benzoquinona. Electroquímicamente estas trayectorias se pueden representar de la siguiente manera: E₁-C₂-C₅-E₆ (línea azul, en la figura 31), E₁-C₂-E₄-C₆ (línea verde) y E₁-E₂-C₃-C₆ (línea roja), en donde E corresponde a un paso Electroquímico y C a un paso químico. Otras trayectorias incluyendo reacciones de disproporción en fase homogénea podrían también tener lugar. Esta misma consideración es válida para ACAF y ACGN, ya que sus propiedades ácidas no difieren mucho de las del APTC. (Tabla 7).

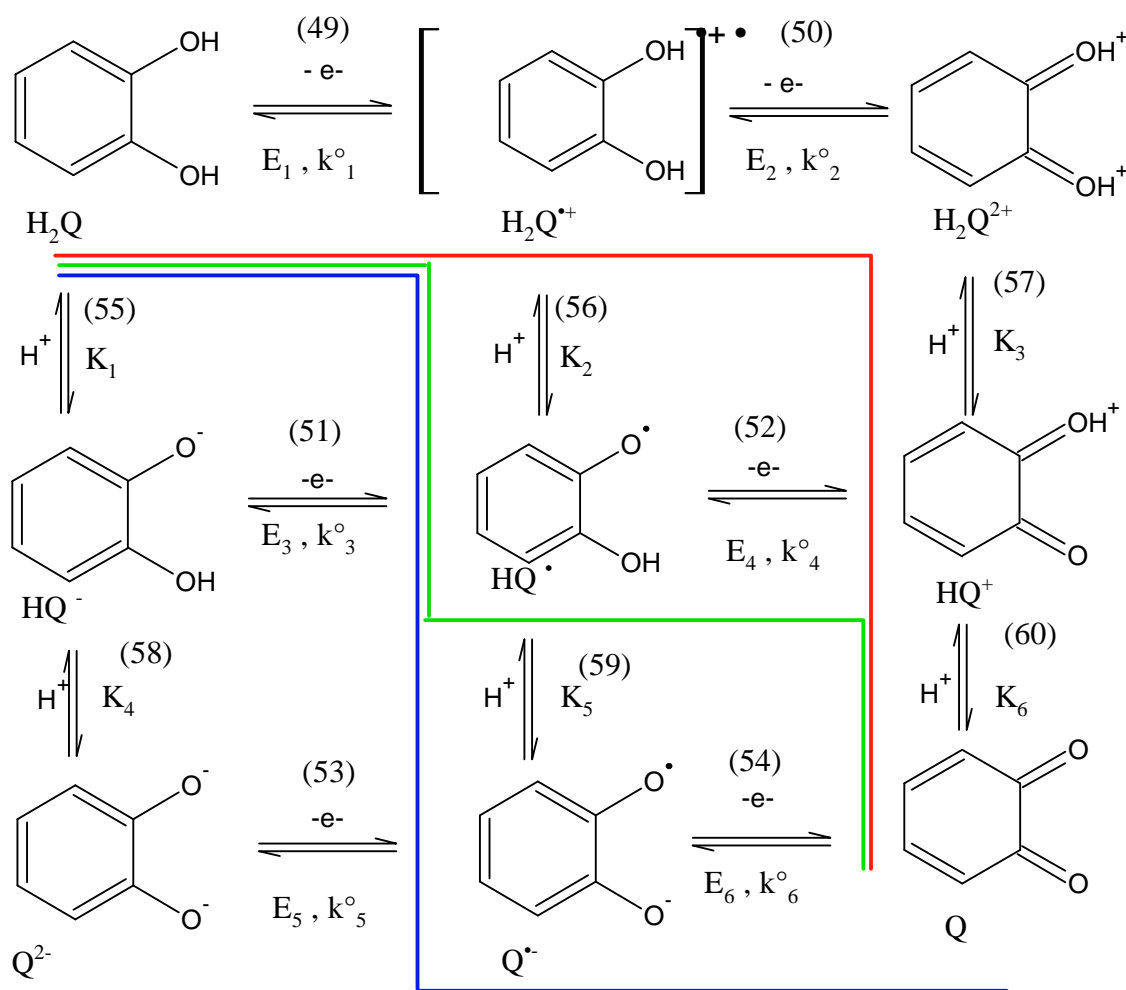


Figura 31. Esquema cuadrado de reacciones para la oxidación de *o*-hidroquinona a *o*-benzoquinona. H₂Q representa a APTC, ACAF Y ACGN y Q a sus respectivas quinonas. E_i representa el potencial para las reacciones de transferencia de electrones, k_i^o la constante de rapidez asociada a dichas transferencias y K_i representa la constante de protonación de la reacción homogénea.

Tabla 7. Valores de pKa de los compuestos *o*-difenólicos.

Compuesto	pKa ₁ (COOH)	pKa ₂ (-OH)	pKa ₃ (-OH)
APTC	4.35 ^a	8.79 ^a	13.00 ^a
ACAF	4.43 ^a	8.69 ^a	-
ACGN	3.34 ^b	8.60 ^c	-

a Referencias [58,59]

b Referencia [60]

c Referencia [61]

Para elucidar cual de estas trayectorias es la mas factible, se llevó a cabo un análisis sistemático de los voltamperogramas cíclicos experimentales utilizando el programa de simulación digital de datos electroquímicos DigiElch versión 4.0^[51].

- **Mecanismo E_{1,2} – C_{3,6}**

Se analizó primero el comportamiento voltamperométrico en términos del mecanismo E_{1,2}-C_{3,6} (línea roja en la figura 31), comenzando con el paso E_{1,2} reacción (61) que resulta de la combinación de las ecuaciones (49) y (50) que corresponde a un proceso de dos electrones formando la quinona diprotonada, H₂Q²⁺, seguido por el paso químico C_{1,2} (ecuaciones (57) y (60), cuya combinación genera la ecuación (62)) correspondiente a la reacción de disociación de H₂Q²⁺ para dar la quinona neutra (Tabla 8). Utilizando el modelo cinético de Butler-Volmer^[60] teniendo como parámetros ajustables E° , k° , y α para la reacción 1 no logramos una buena concordancia con los resultados experimentales, particularmente para el pico catódico I_c, ya que en todos los casos el pico obtenido por simulación es mucho más agudo que el experimental. La Figura 32a muestra un ejemplo del mejor ajuste que se logró obtener con este mecanismo y modelo cinético de transferencia de electrones. En la Tabla 8a se presentan los parámetros utilizados en la simulación. Claramente, este mecanismo no explica la forma de los voltamperogramas cíclicos experimentales.

Posteriormente, se ensayó para el mismo mecanismo el modelo de cinética de transferencia de electrones de Marcus,^[61] el cual permite explicar mejor la presencia de picos anchos. En este caso el coeficiente de transferencia de electrones α no es constante como en el modelo de Butler-Volmer, sino que varía con el potencial de

acuerdo con la ecuación (63), en donde λ corresponde la energía de reorganización interna.

$$\alpha = \frac{1}{2} + \frac{F(E - E^0)}{2\lambda} \quad (63)$$

Tabla 8. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 mM. Simulación basada en un mecanismo E_{1,2}-C_{3,6}, reacciones (61) y (62), de acuerdo con a) el modelo de Butler-Volmer y b) el modelo de Marcus.

a. Modelo de Butler-Volmer				
Reacciones electroquímicas		E° (V)	α	k ° _{1,2} (cm/s)
H ₂ Q	\rightleftharpoons H ₂ Q ²⁺ + 2e ⁻ (61)	0.420	0.670	9.8 × 10 ⁻⁵
Reacciones químicas		K _{3,6} (M)	k _f (s ⁻¹)	k _b (M ⁻¹ s ⁻¹)
H ₂ Q ²⁺	\rightleftharpoons Q + 2H ⁺ (62)	1.0 × 10 ⁷	0.10	1.0 × 10 ⁻⁸
D (Todas las especies)		6.25 × 10 ⁻⁶ cm ² /s		

Tabla 8b. Modelo de Marcus				
Reacciones electroquímicas		E° (V)	λ	k ° _{1,2} (cm/s)
H ₂ Q	\rightleftharpoons H ₂ Q ²⁺ + 2e ⁻ (61)	0.452	1.0	5.2 × 10 ⁻⁴
Reacciones químicas		K _{3,6} (M)	k _f (s ⁻¹)	k _b (M ⁻¹ s ⁻¹)
H ₂ Q ²⁺	\rightleftharpoons Q + 2H ⁺ (62)	1.0 × 10 ⁷	0.03	3.0 × 10 ⁻⁹
D (Todas las especies)		6.8 × 10 ⁻⁶ cm ² /s		

Los mismos parámetros de simulación se utilizaron para todas las velocidades de barrido, comprendidas entre 0.03 y 10.00 V/s. Potenciales V vs. Ag/AgCl. Temperatura: 25 °C. Durante el experimento la resistencia no se compensó electrónicamente, por lo que el total de esta, 20 Ω, se incluyó durante la simulación.

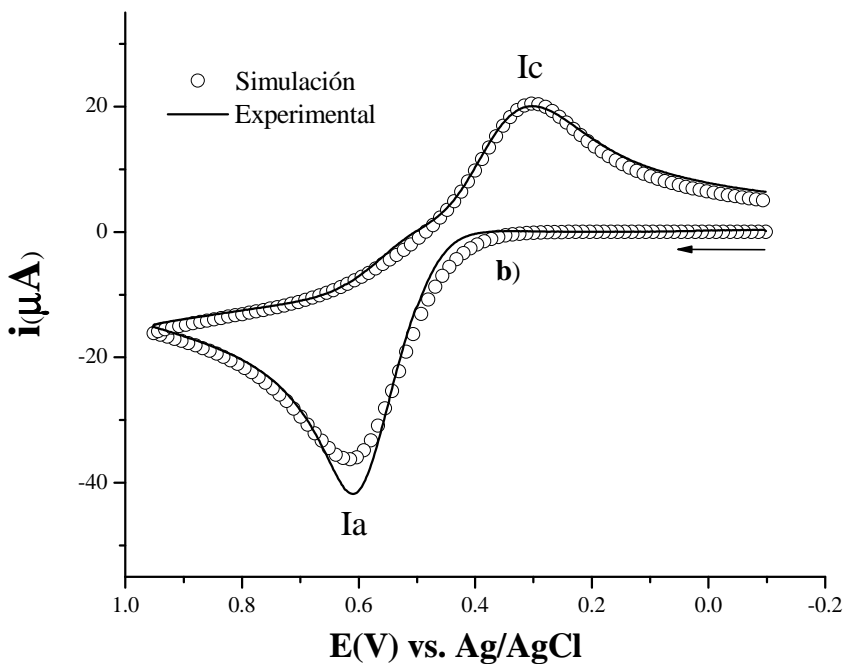
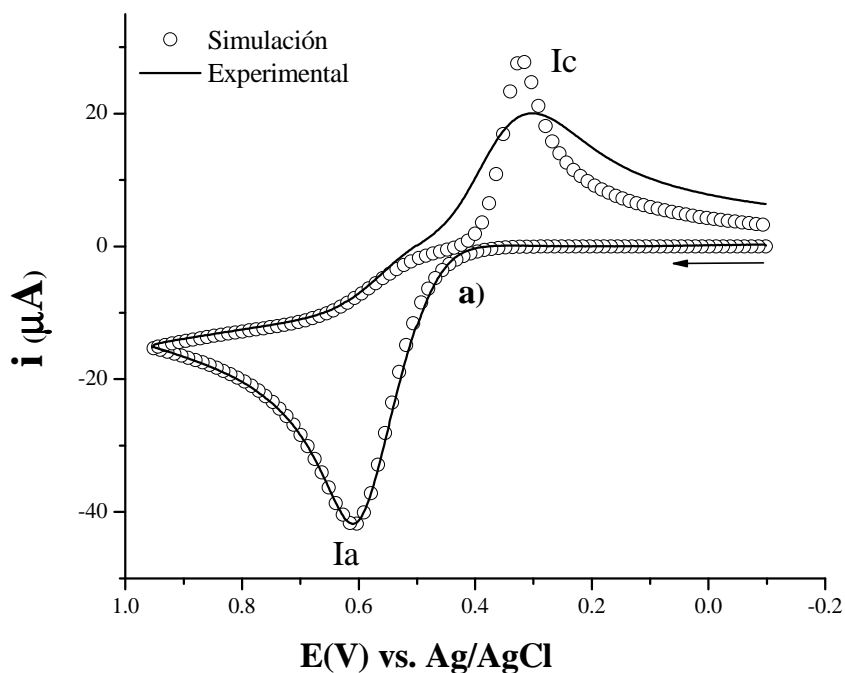


Figura 32. Voltamperogramas cíclicos experimentales (línea continua) de APTC 1.09 mM, en disolución acuosa conteniendo KCl 1.0 M a 25 °C y velocidad de barrido de 0.2 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo. Simulaciones (círculos) basadas en un mecanismo $E_{1,2}-C_{3,6}$, reacciones (60) y (61), de acuerdo con el modelo cinético de transferencia de electrones de: a) Butler-Volmer y b) Marcus de acuerdo a los parámetros descritos en las Tablas 9a y 9b, respectivamente.

En la Figura 32b se presenta una comparación entre el voltamperograma cíclico experimental y la simulación utilizando el modelo de Marcus con el mecanismo descrito por las reacciones (61) y (62) (Tabla 8). En este caso es posible observar que el ajuste, particularmente en la región del pico catódico (I_c), es mucho mejor. Sin embargo, ahora la forma del pico anódico no concuerda con lo observado experimentalmente, básicamente el mismo comportamiento se observó para todas las concentraciones y todas velocidades de barrido estudiadas. En la tabla 8b se presentan los parámetros que proporcionaron el mejor ajuste a los voltamperogramas cíclicos experimentales.

- **Mecanismo $E_1 - E_2 - C_{3,6}$**

La carencia de ajuste entre el experimento y la simulación, condujo a probar otro mecanismo.

El siguiente mecanismo que se consideró fue el mecanismo $E_1-E_2-C_{3,6}$, el cual involucra dos transferencias de electrón consecutivas, formando el catión radical y en seguida el dicatión (reacciones (49) y (50), Figura 31 y Tabla 9), seguidas por la disociación, en un solo paso, del dicatión generando la quinona neutra (reacción (62), Tabla 9). En la Figura 33 se observa que utilizando este mecanismo se obtuvieron mejores resultados que con el mecanismo $E_{1,2}-C_{3,6}$, sin embargo, no se logra un buen ajuste para la onda catódica I_c , ya que, el pico obtenido por simulación es todavía ligeramente más agudo que el pico obtenido experimentalmente. Este mismo comportamiento se observó para todas las velocidades de barrido, así como para otras concentraciones. Se pudo también observar que las simulaciones no son sensibles al valor de la constante de equilibrio de la reacción (62), ya que se encontró que valores del orden de 10^7 ó bien de 10^{-3} proveen igualmente buen ajuste, esto sugiere que es necesario contar con una medida experimental independiente de dicha constante.

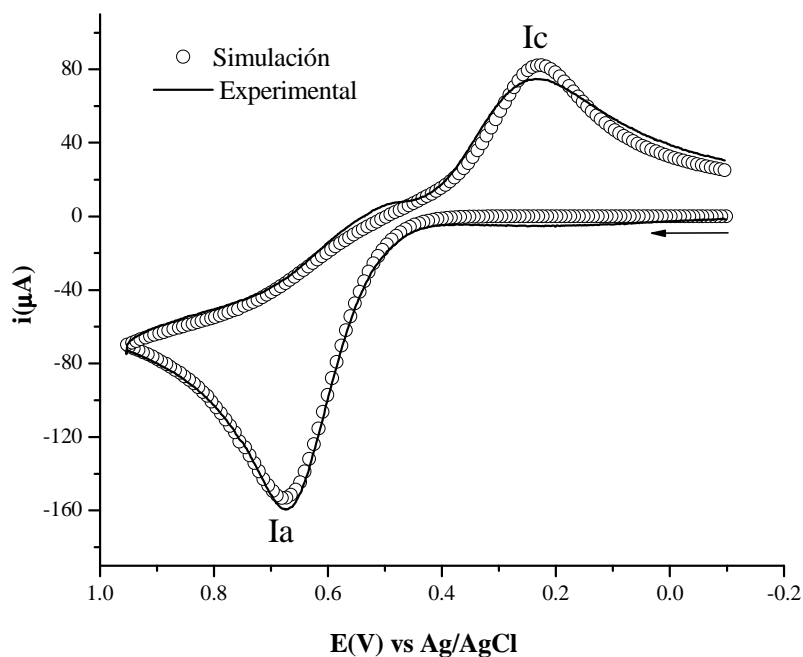


Figura 33. Voltamperogramas cíclicos experimentales (línea continua) de APTC 1.09 mM, en disolución acuosa conteniendo KCl 1.0 M a 25 °C a una velocidad de barrido de 3.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo. Simulación (círculos) de acuerdo al mecanismo E₁-E₂-C_{3,6}, reacciones (49), (50) y (62).

Parámetros de simulación en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 M. Simulación basada en un mecanismo E₁-E₂-C_{3,6}, reacciones (49), (50) y (62), usando el modelo de Butler-Volmer.

Reacciones electroquímicas	E° (V)	α	k° (cm/s)
$H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{*+} + e^-$ (49)	0.521	0.5	4.5×10^{-3}
$H_2Q^{*+} \rightleftharpoons H_2Q^{2+} + e^-$ (50)	0.447	0.5	5.5×10^{-4}
Reacciones químicas	K (M)	k _f (s ⁻¹)	k _b (M ⁻¹ s ⁻¹)
$H_2Q^{2+} \rightleftharpoons Q + 2H^+$ (62)	1.0×10^{-3}	0.031	3.1×10^2
D (Todas las especies)	7.00×10^{-6} cm ² /s		

Los mismos parámetros de simulación se utilizaron para todas las velocidades de barrido, comprendidas entre 0.03 y 10.00 V/s. Potenciales V vs. Ag/AgCl. Temperatura: 25 °C. Durante el experimento la resistencia no se compensó electrónicamente, por lo que el total de esta, 20 Ω, se incluyó durante la simulación.

- **Mecanismo E₁ – C_{2,5} – E₆**

El siguiente paso fue determinar si el mecanismo E₁-C_{2,5}-E₆ (representado por la línea azul, Figura 31) podía explicar mejor los voltamperogramas obtenidos a las diferentes concentraciones y velocidades de barrido. Para tal propósito se incluyeron en el programa de simulación las siguientes reacciones: la oxidación de un electrón del catecol dando la semiquinona catión radical (reacción (49)), seguido por la disociación en un solo paso de la semiquinona catión radical generando la semiquinona anión radical (reacción (64)), que surge de la combinación de las reacciones (49) y (54)), la que finalmente por oxidación de un electrón conduce a la formación la quinona neutra (reacción (54)), en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 M. Simulación basada en un mecanismo E₁-C_{2,5}-E₆, reacciones (49), (54) y (64), usando el modelo cinético de Butler-Volmer.

Reacciones electroquímicas	E° (V)	α	k° (cm/s)
$\text{H}_2\text{Q} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{Q}^{*+} + \text{e}^-$ (49)	0.518	0.5	4.2×10^{-3}
$\text{Q}^- \rightleftharpoons \text{Q} + \text{e}^-$ (54)	0.416	0.44	1.2×10^{-3}
Reacciones químicas	K (M)	k _f (s ⁻¹)	k _b
$\text{H}_2\text{Q}^{*+} \rightleftharpoons \text{Q}^- + 2\text{H}^+$ (64)	0.186	7.2×10^{-9}	3.9×10^{10}
D (Todas las especies)		7.00×10^{-6} cm ² /s	

Los mismos parámetros de simulación se utilizaron para todas las velocidades de barrido, comprendidas entre 0.03 y 10.00 V/s. Potenciales V vs. Ag/AgCl. Temperatura: 25 °C. Durante el experimento la resistencia no se compensó electrónicamente, por lo que el total de esta, 20 Ω, se incluyó durante la simulación.

Este mecanismo produjo una mejor concordancia con los voltamperogramas experimentales, que los mecanismos E_{1,2}-C_{3,6} y E₁-E₂-C_{3,6}. Sin embargo, para diferentes series de experimentos que se estudiaron, se observó que utilizando un mismo grupo de parámetros para todas las velocidades de barrido estudiadas, no fue posible obtener un buen ajuste, principalmente en la región del pico de reducción I_c. El principal problema fue que el grupo de parámetros que proveía mejores ajustes para las

bajas velocidades de barrido, no permitía buen ajuste para las altas velocidades de barrido y viceversa. La Tabla 10 muestra los parámetros con los cuales logramos obtener una menor desviación entre la simulación y los voltamperogramas cíclicos experimentales obtenidos a todas las velocidades de barrido.

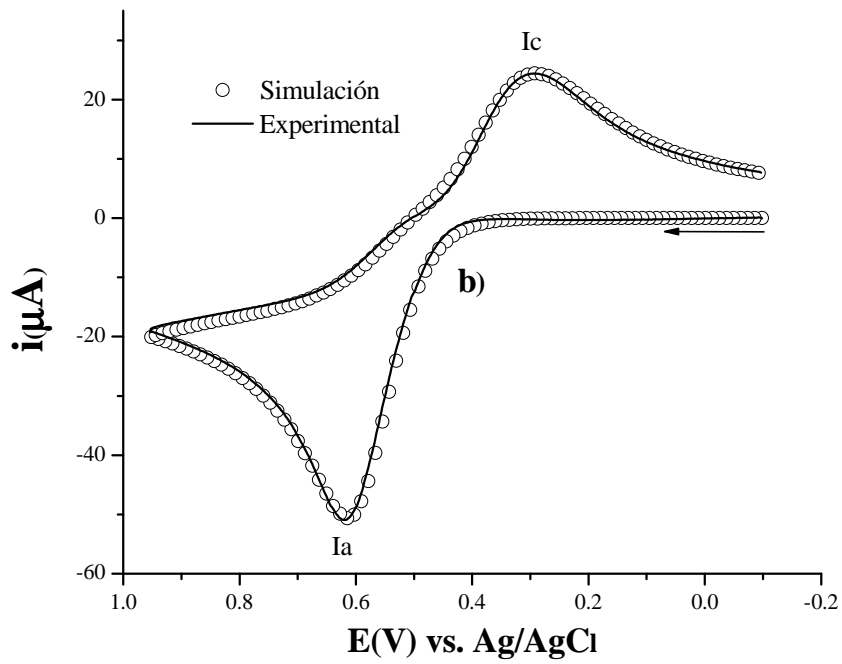
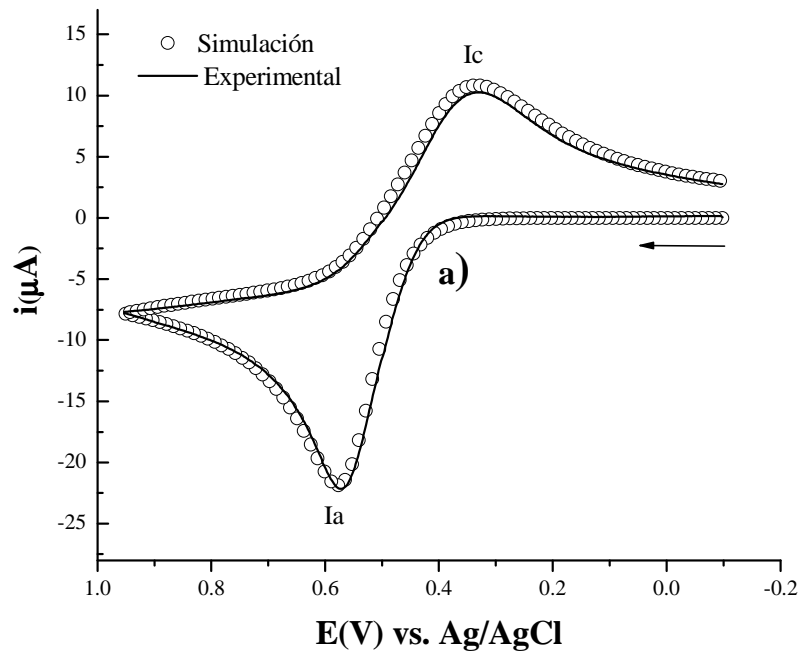
- **Mecanismo E₁ – C₂ – E₄ – C₆**

Nuestra siguiente alternativa fue entonces el mecanismo E₁-C₂-E₄-C₆ (representado por la línea verde en la Figura 31), correspondiente a la secuencia de reacciones (49) → (56) → (52) → (60) que se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros utilizados para la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa de KCl 1.0 M. Simulación basada en un mecanismo E₁-C₂-E₄-C₆, reacciones (49), (56), (52) y (60) respectivamente, con el modelo cinético de Butler-Volmer.

Reacciones electroquímicas	E° (V)	α	k° (cm/s)
$\text{H}_2\text{Q} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{Q}^{*+} + \text{e}^-$ (49)	0.664	0.48	0.043
$\text{HQ}^{\bullet} \rightleftharpoons \text{HQ}^+ + \text{e}^-$ (52)	0.516	0.61	0.043
Reacciones químicas		K (M)	k _f (s ⁻¹)
$\text{H}_2\text{Q}^{*+} \rightleftharpoons \text{HQ}^{\bullet} + \text{H}^+$ (56)	0.02	1.0×10^{10}	5.0×10^{11}
$\text{HQ}^+ \rightleftharpoons \text{Q} + \text{H}^+$ (60)	0.6	1.0×10^{10}	1.7×10^{11}
D (Todas las especies)		$7.00 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	

Los mismos parámetros de simulación se utilizaron para todas las velocidades de barrido, comprendidas entre 0.03 y 10.00 V/s. Potenciales V vs. Ag/AgCl. Temperatura: 25 °C. Durante el experimento la resistencia no se compensó electrónicamente, por lo que el total de ésta, 20 Ω, se incluyó durante la simulación.



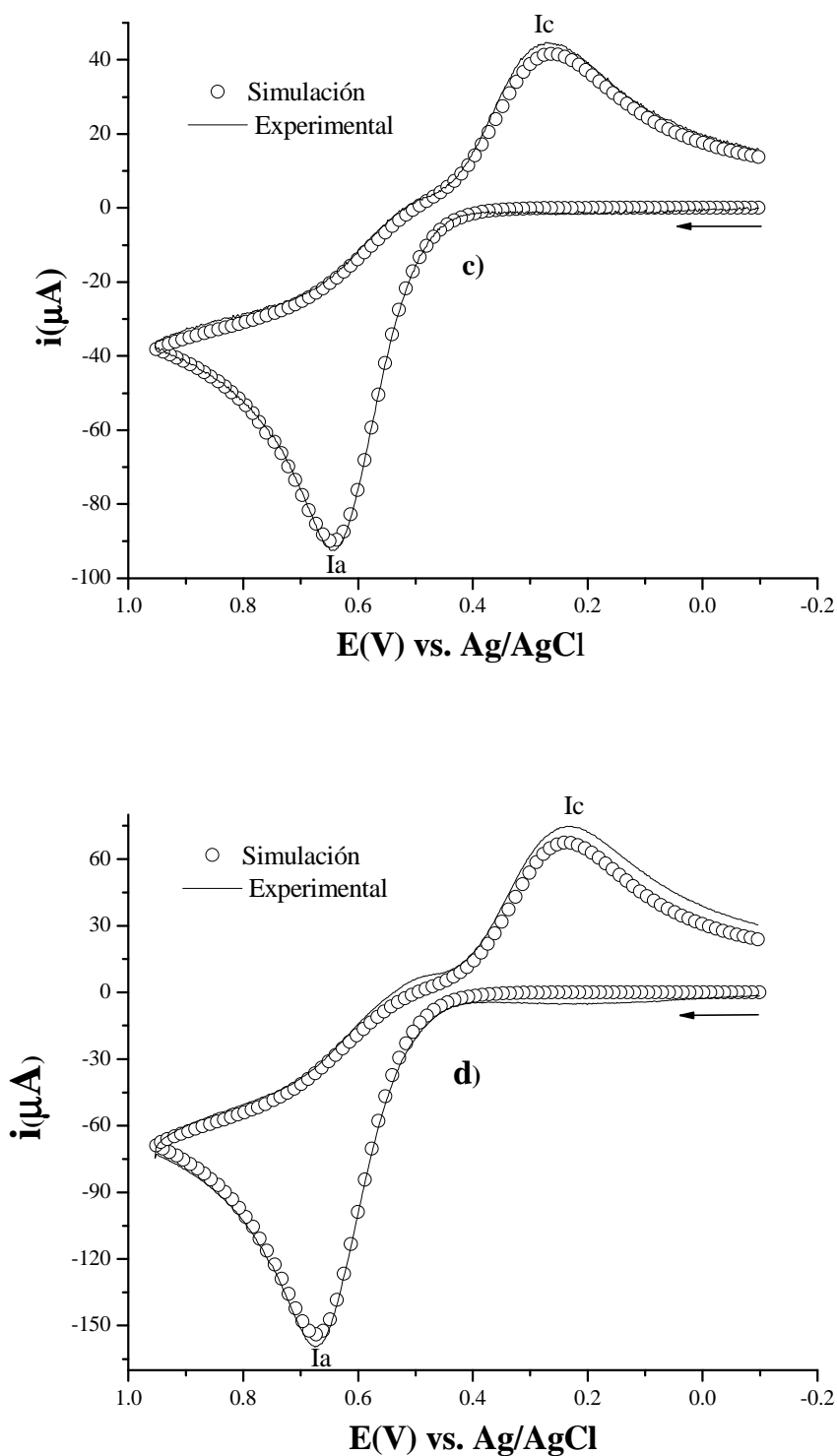


Figura 34. Voltamperogramas cíclicos experimentales (línea continua) de ácido protocatecuico 1.09 mM en disolución acuosa conteniendo KCl 1.0 M a 25 °C a diferentes velocidades de barrido: a) 0.05 V/s, b) 0.3 V/s, c) 1.0 V/s, d) 3.0 V/s. Electrodo de trabajo: C vítreo. Simulación (círculos) de acuerdo al mecanismo $E_1-C_2-E_4-C_6$, reacciones (49), (56), (52) y (60) respectivamente, con los parámetros de simulación mostrados en la Tabla 11.

Para esta propuesta mecanística se observa que el ajuste obtenido para todos nuestros voltamperogramas experimentales fue mucho mejor que con cualquiera de los otros mecanismo ensayados, presentándose en dicha tabla los parámetros voltamperométricos que proveyeron mejor ajuste con los voltamperogramas experimentales a todas las velocidades de barrido.

La Figura 34 (voltamperogramas 34a a 34d) muestra algunos ejemplos representativos del ajuste a los voltamperogramas cíclicos experimentales de APTC, empleando los parámetros descritos en la Tabla 11.

5.3 Caracterización del fenómeno de inclusión entre α - y β - ciclodextrinas y los compuestos *o*-difenólicos.

5.3.1 Estudio por voltamperometría cíclica.

Con el fin de observar la posible formación de complejos de inclusión entre los compuestos *o*-difenólicos y las ciclodextrinas, se realizó la adición de concentraciones crecientes de α - y β -CD a soluciones acuosas de APTC, ACAF y ACGN y se estudió su comportamiento voltamperométrico, se observó en todos los casos una disminución sustancial en las corrientes de los picos I_a y I_c , así como también un incremento en el $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$, con el pico de oxidación I_a desplazándose a valores mas positivos y el de reducción I_c a valores menos positivos. La magnitud del cambio en la corriente y en el ΔE_p fue dependiente de la concentración de CD utilizada. Ejemplos representativos de éste comportamiento se muestran en las Figuras 35, 36 y 37.

Debido a que las CD son compuestos macrocíclicos, la incorporación de una molécula huésped en su cavidad hidrofóbica disminuye la difusividad de dicha molécula huésped con respecto a su forma libre^[60,62, 63] y dado que la corriente de pico es proporcional a la raíz cuadrada del coeficiente de difusión, entonces la disminución en el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, o molécula huésped, es la responsable de la disminución observada en la corriente de ambos picos. Por otra parte, debido a que la especie electroactiva se encuentra dentro de la cavidad de la CD, es razonable que el potencial de oxidación se desplace a valores más positivos que la oxidación del

compuesto libre. Así, los experimentos voltamperométricos evidencian claramente que el compuesto *o*-difenólico se está incluyendo en la cavidad de la ciclodextrina.

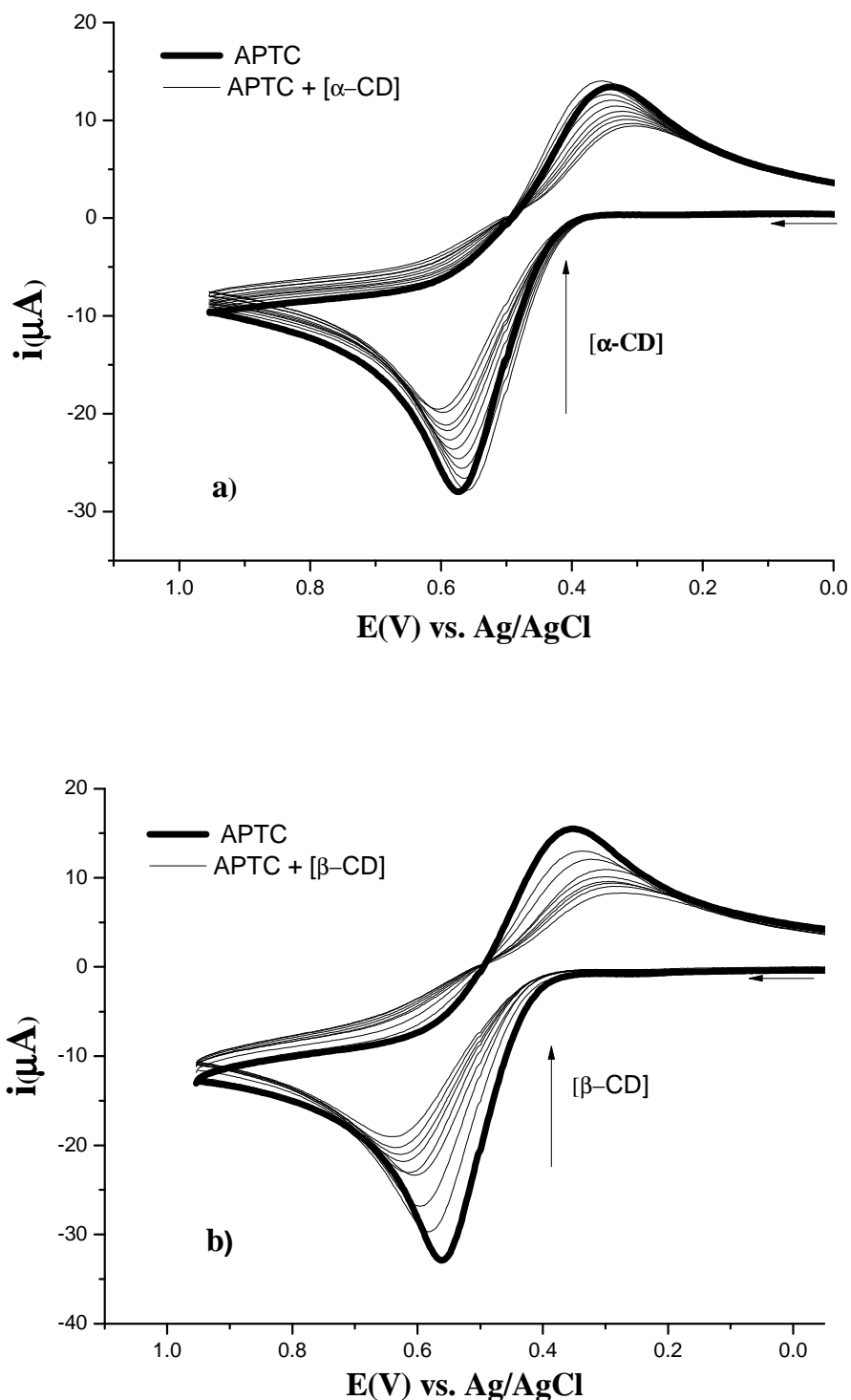


Figura 35. Voltamperogramas cíclicos de APTC en a) 1.07 mM y b) 1.26 mM en KCl 1 M a 25°C y 0.1 V/s, en presencia de concentraciones crecientes de: a) α -CD (0.50, 1.01, 1.51, 2.00, 2.49, 2.97, 3.45, 3.93, 4.39, 4.86 mM), y en b) β -CD (1.13, 2.25, 4.31, 5.49, 6.62, 8.12, 9.29 mM).

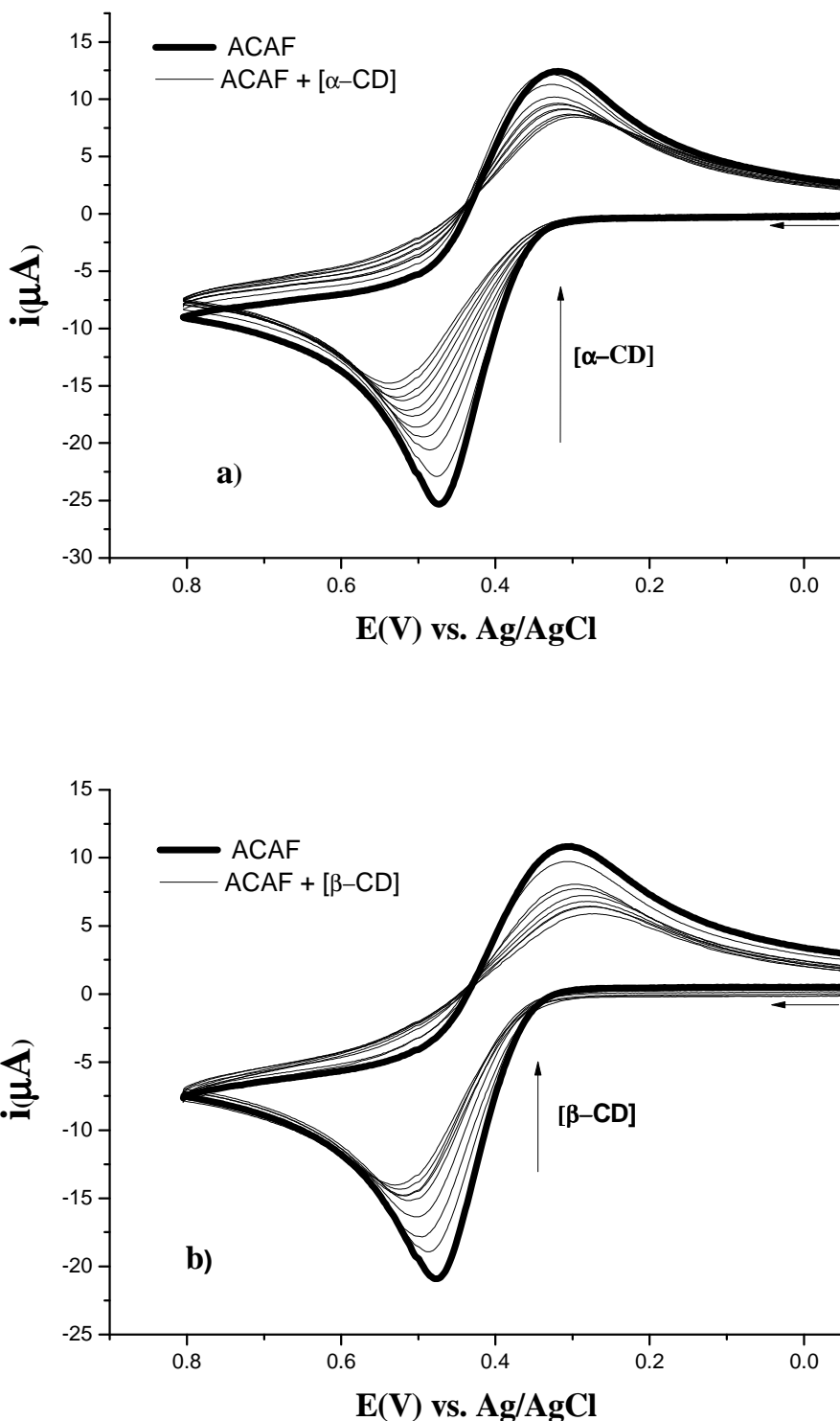


Figura 36. Voltamperogramas cíclicos de ACAF a) 0.73 mM b) 0.69 mM en KCl 1 M a 25°C y 0.1 V/s, en presencia de concentraciones crecientes de: a) $\alpha\text{-CD}$ (0.50, 0.99, 1.49, 1.98, 2.46, 2.94, 3.41, 3.88, 4.34, 4.81 mM), b) $\beta\text{-CD}$ (1.37, 2.37, 3.31, 4.37, 5.55, 6.54, 7.90, 8.87 mM).

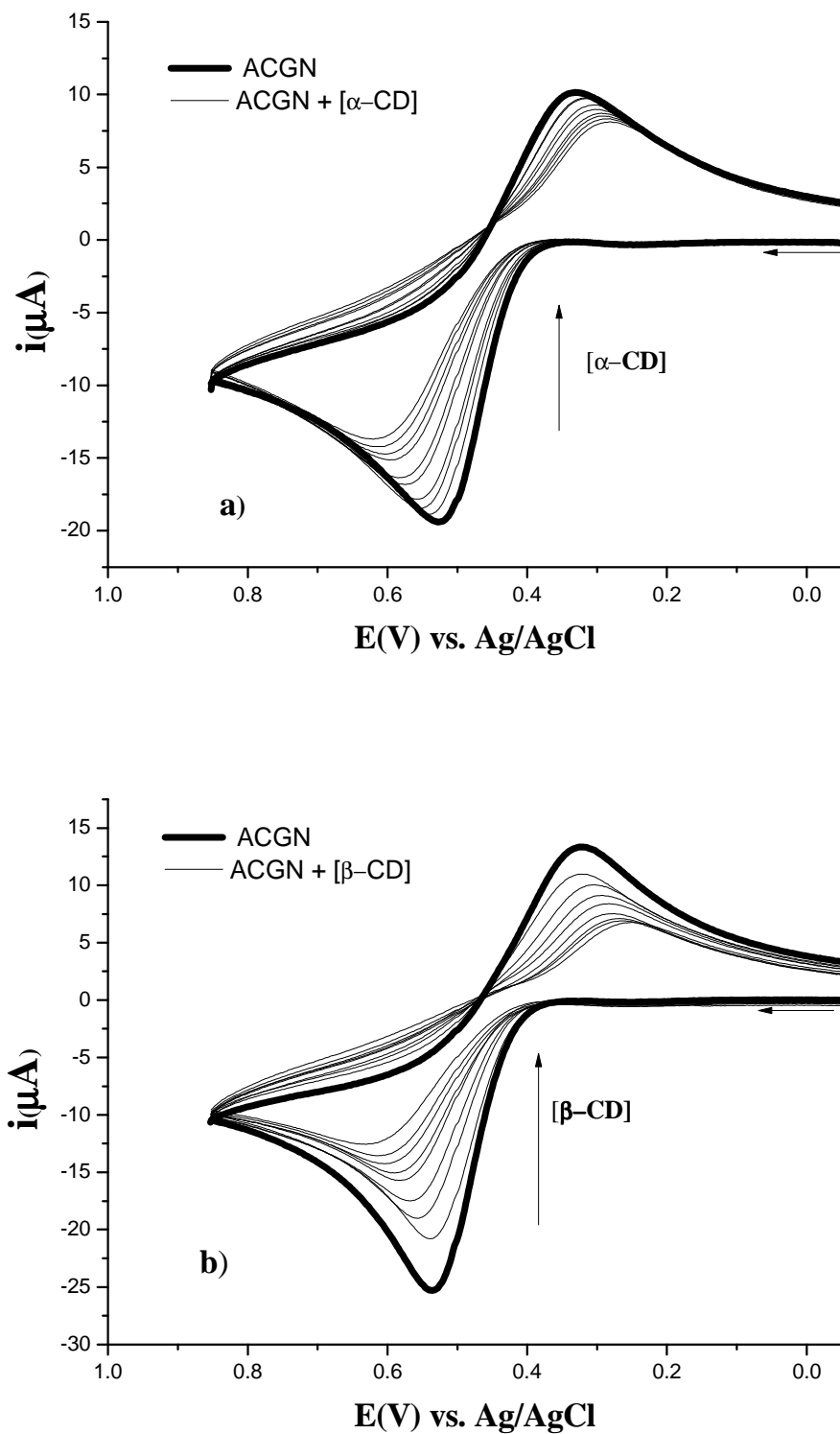


Figura 37. Voltamperogramas cíclicos de ACGN a) 1.01 mM b) 1.04 mM en KCl 1.0 M a 25°C y 0.1 V/s, en presencia de concentraciones crecientes de: a) $\alpha\text{-CD}$ (0.50, 0.99, 1.48, 1.97, 2.45, 2.92, 3.40, 3.86, 4.33, 4.79 mM), b) $\beta\text{-CD}$ (1.28, 2.36, 3.35, 4.37, 5.68, 6.98, 8.30, 10.35 mM).

5.3.2 Determinación de las constantes de formación, K_f , mediante el modelo de Evans y colaboradores.

Para la determinación de las constantes de formación de los complejos de inclusión se empleó el modelo de Evans y colaboradores ^[62,63] quienes sugieren que la corriente de los picos voltamperométricos del huésped en presencia de CD es proporcional a un coeficiente de difusión aparente, D_{app} , que contiene la contribución de los coeficientes de difusión del huésped libre, D_f y del complejo de inclusión, D_c , de acuerdo con la ecuación (65), en donde x es la fracción de complejo formado, que está correlacionada con la constante de equilibrio para la formación del complejo (K_f) de acuerdo con la ecuación (66) en donde $[CD]_0$ es la concentración de CD en el seno de la disolución. Esta ecuación considera que la estequiometría del complejo de inclusión es 1:1, esto es, una molécula de CD incorpora en su cavidad una molécula del compuesto huésped. Estudios previos por otros autores (ver sección 5.3.3), así como determinaciones realizadas por nuestro grupo de investigación utilizando la técnica de calorimetría demuestran que la estequiometría de los complejos de inclusión aquí estudiados es 1:1.

$$D_{app} = xD_c + (1-x)D_f \quad (65)$$

$$K_f = \frac{x}{[CD]_0(1-x)} \quad (66)$$

Mediante la combinación de las ecuaciones (65) y (66) y basándose en el hecho que la corriente de pico es proporcional a la raíz cuadrada del coeficiente de difusión, Evans y colaboradores obtuvieron la expresión matemática que se muestra en la ecuación (67). Esta ecuación correlaciona la variación en la corriente de pico en función de la concentración de CD, permitiendo obtener de manera cuantitativa las constantes de formación del complejo de inclusión, en donde i_p e $i_{p,o}$ son la corriente en presencia y en ausencia de CD, respectivamente. En este caso los valores de i_p corresponden a la corriente que se obtiene de los voltamperogramas experimentales registrados para diferentes concentraciones de CD.

$$\left(\frac{i_p}{i_{p,o}}\right)^2 = \frac{1}{K_f [CD]_0} \left[1 - \left(\frac{i_p}{i_{p,o}}\right)^2 \right] + \frac{D_c}{D_f} \quad (67)$$

Reordenando la ecuación (67) para obtener directamente de la pendiente el valor del inverso de la constante de formación del complejo, es decir la constante de disociación del complejo, K_d (pendiente = $K_d = 1/ K_f$), se obtiene la ecuación (68):

$$\frac{\left(\frac{i_p}{i_{p,o}}\right)^2}{\left[1 - \left(\frac{i_p}{i_{p,o}}\right)^2 \right]} = \frac{1}{K_f [CD]_0} + \frac{\frac{D_c}{D_f}}{\left[1 - \left(\frac{i_p}{i_{p,o}}\right)^2 \right]} \quad (68)$$

En la Figura 38 se representan las gráficas de $(i_p/i_{p,o})^2 / (1 - (i_p/i_{p,o})^2)$ vs. $[CD]^{-1}$ para los resultados experimentales de ACAF con α - y β -CD, todos los demás sistemas estudiados presentaron también un buen ajuste lineal. Cabe mencionar que este ajuste lineal se obtiene para concentraciones de CD mayores a la estequiometría 1:1 con respecto al compuesto *o*-difenólico, ya que a concentraciones inferiores de CD, el ajuste resulta polinomial, y el modelo de Evans no puede aplicarse. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, obteniéndose una alta reproducibilidad en los datos. Los valores de las constantes de formación del complejo de inclusión (K_f) se reportan en la Tabla 12, donde se observa que los valores de las constantes de formación para todos los compuestos y con ambas ciclodextrinas se encuentran prácticamente en el mismo orden de magnitud, por lo que es difícil establecer tendencias estructurales, excepto que aparentemente los derivados del ácido cinámico se asocian preferentemente con la α -CD, mientras que el derivado del ácido benzoico lo hace preferentemente con la β -CD. Sin embargo, es necesario extender estos estudios a otros compuestos de estas familias, para poder observar tendencias más claras. Los valores de las constantes de formación muestran que el fenómeno de inclusión se da favorablemente, de tal manera que el compuesto *o*-difenólico prefiere estar incluido dentro de la cavidad hidrofóbica de la CD, a estar en su forma libre.

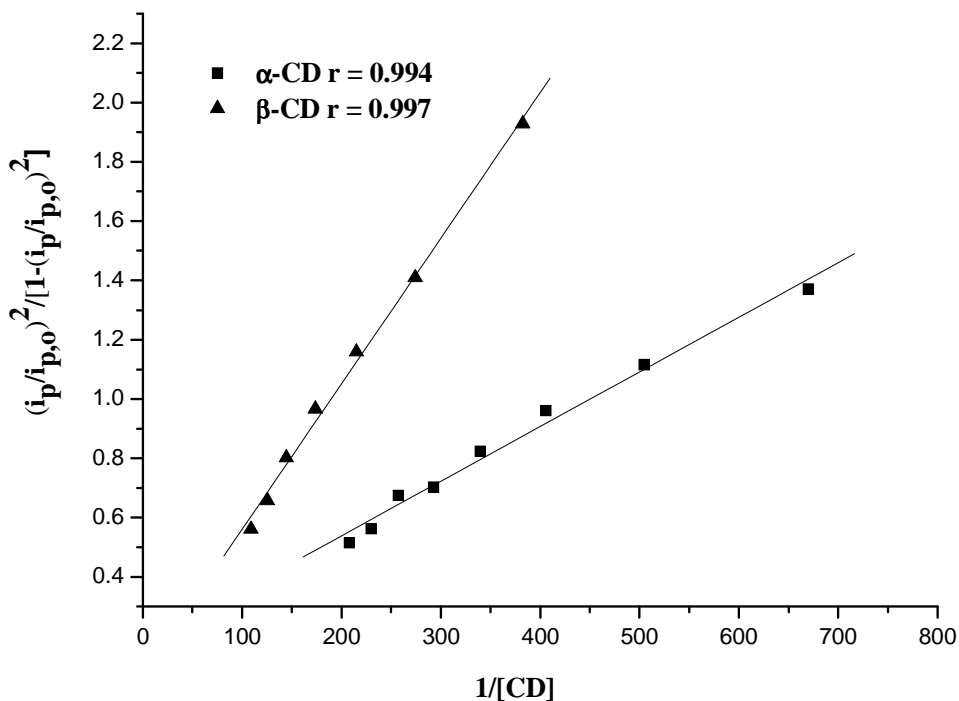


Figura 38. Determinación de la constante de formación del complejo de inclusión entre ACAF 0.73 mM con α -CD (cuadrados) y ACAF 0.69 mM con β -CD (triángulos), de acuerdo a la ecuación (68), para α -CD, $K_f = 268.5$ para β -CD, $K_f = 166.0$

Tabla 12. Constantes de formación^a para los complejos de inclusión de los compuestos *o*-difenólicos con α - y β -CD.

Compuesto	Ciclodextrina	K_f	Log K_f
APTC	α -CD	157.40	2.197
APTC	β -CD	352.40	2.547
ACAF	α -CD	268.50	2.429
ACAF	β -CD	166.00	2.220
ACGN	α -CD	431.50	2.635
ACGN	β -CD	371.50	2.570

^a Determinados por voltamperometría cíclica de acuerdo con el modelo descrito por Evans y col., ecuación (68).

Es importante mencionar, que el modelo de Evans, ecuación (67), se ha aplicado anteriormente y de manera exitosa en la determinación de constantes de formación de

complejos de inclusión con diversas moléculas huésped, como por ejemplo en la oxidación de catecolaminas^[64] y en la reducción de antraquinonas^[65] en medio acuoso. Adicionalmente en nuestro trabajo encontramos que la aplicación del modelo de Evans (ecuación (68)), ajusta muy bien a los resultados experimentales permitiendo obtener tendencias lineales con alta reproducibilidad (Figura 38), siempre y cuando la CD se encuentre ligeramente en exceso con respecto al catecol. La comparación entre nuestros valores y los que ya se encuentran reportados en la literatura se presenta en la sección 5.3.3.

5.3.3 Resultados por otros autores que sirven de apoyo a nuestros resultados.

5.3.3.1 Estequiometría, fuerzas estabilizadoras y orientación de las moléculas de ACGN y ACAF en el complejo con β -CD.

La estequiometría 1:1 de los complejos de inclusión con ciclodextrinas de compuestos estructuralmente parecidos a los estudiados en esta tesis, ha sido comprobada por diversos autores por ejemplo en el caso de los ácidos cumáricos^[66] e incluso para el ACGN^[67].

El estudio de M. Strazisar y sus colaboradores^[66] consistió en preparar complejos de inclusión de diversos ácidos cumáricos con β -CD por el método de coprecipitación a fin de poder realizar determinaciones simultáneas de la relación estequiométrica entre la molécula huésped y la CD y de las constantes de estabilidad de dichos complejos. Mediante las técnicas de IR, estudios de solubilidad de fases, técnicas de lavados con diversos disolventes y espectrometría de masas, obtuvieron que la estequiometría de esta clase de complejos es 1:1.

Peter L. Irwin y colaboradores^[67] estudiaron la formación de los complejos de inclusión de ACGN en presencia de α -, β -, y γ -CD's y β -CD polimerizada a diferentes valores de pH, fuerza iónica y temperatura en sistemas amortiguados y en jugo de manzana. Los parámetros termodinámicos de estos complejos se obtuvieron en disolución mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis. Estudios de ¹H NMR permitieron comprobar que la estequiometría para los complejos es 1:1.

Como se mencionó en la sección 3.9 de este trabajo, el proceso de inclusión ocurre cuando la parte apolar del compuesto *o*-difenólico, se introduce en la cavidad hidrofóbica de la CD^[44,67,68], este proceso se favorece principalmente por las variaciones entrópicas del sistema debidas a efectos de solvatación, tanto de las moléculas de agua que son desplazadas del interior de la cavidad al ocurrir el fenómeno de inclusión, como las fuerzas de Van der Waals^[38, 44] que se generan al incluirse la molécula huésped cuando se forma el complejo.

Górnas y colaboradores^[44] mediante cálculos de dinámica molecular determinaron la orientación mas favorable de las moléculas de ACGN y ACAF en el complejo de inclusión con β -CD. Para cada uno de los complejos, ACGN: β -CD y ACAF: β -CD, calcularon dos posibles orientaciones, en ambos se consideró que el anillo aromático quedaba incluido en la cavidad de la ciclodextrina, en el primer sistema (orientación 1) los grupos -OH de la molécula huésped están dirigidos hacia la cara primaria de la ciclodextrina y en el segundo sistema (orientación 2), los -OH del huésped quedan orientados hacia la cara secundaria de la ciclodextrina. (Figuras 39 y 40). La optimización por minimización de la energía mostró que en el caso del ACAF la orientación 1 es mas favorecida por 80.1 kJ/mol que la orientación 2 (Figura 39), mientras para el ACGN la orientación 2 es la más favorecida por una magnitud similar, 80.3 kJ/mol (Figura 40). Las energías de los complejos se calcularon considerando al agua como disolvente, bajo estas condiciones los resultados muestran que los complejos de inclusión de β -CD con ACGN son energéticamente más favorables que los complejos con ACAF. La optimización de la geometría de estos complejos indica que con excepción del complejo del ACGN en la orientación 2 (Figura 40b), las interacciones por puente de hidrógeno no juegan un papel importante en la estabilización de los complejos, lo que sugiere de nuevo que son las interacciones de van der Waals las que proveen la estabilidad de los complejos. Para el complejo ACGN: β -CD en la orientación 2, se encontró un puente de hidrogeno entre el oxígeno del grupo éster del ACGN y uno de los grupos hidroxilo primarios (en la cara primaria) de la β -CD.

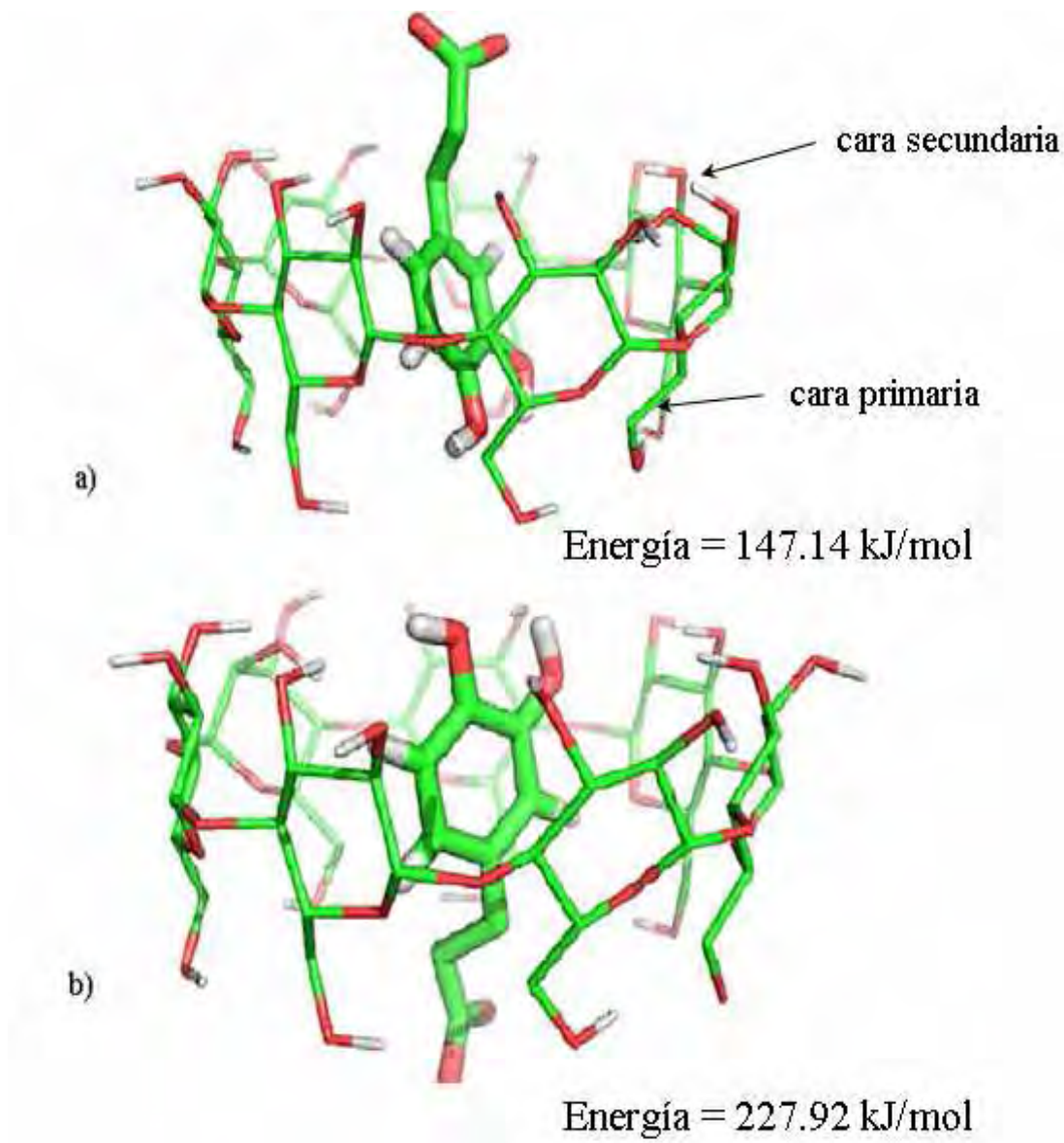


Figura 39. Tomada de [44]. Estructuras de las dos posibles orientaciones del ACAF al formar el complejo de inclusión con β -CD, a) orientación 1, b) orientación 2. La orientación 1 es la energéticamente más favorecida

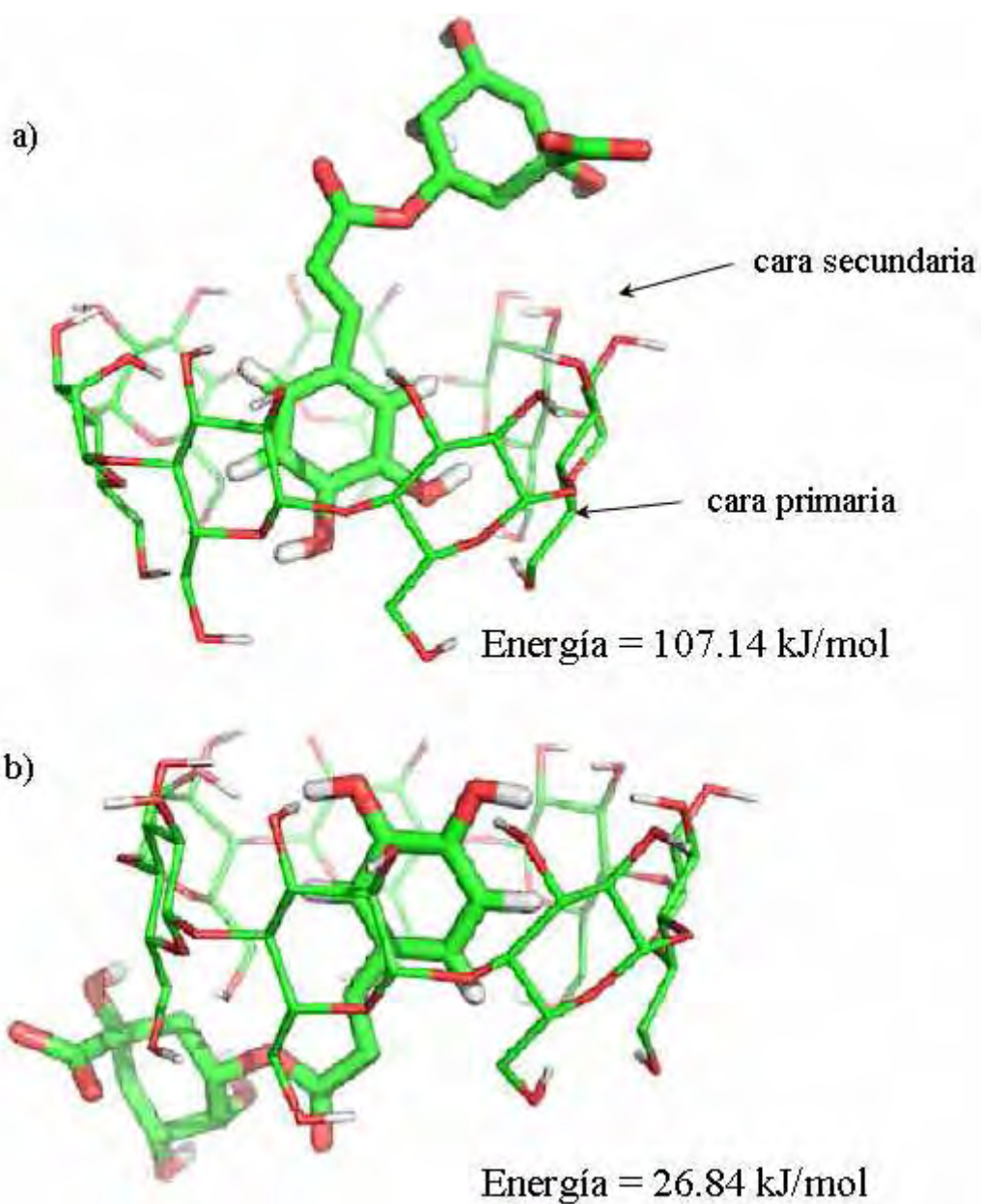


Figura 40. Tomada de [44]. Estructuras de las dos posibles orientaciones del ACGN al formar el complejo de inclusión con β -CD, a) orientación 1, b) orientación 2. La orientación 2 es favorecida energéticamente.

5.3.3.2 Valores de las constantes de formación para los compuestos *o*-difenólicos encontrados en la literatura y comparación con nuestros resultados.

En la tabla 13 se muestran los valores obtenidos por diversas técnicas para las constantes de formación de los complejos de inclusión con los compuestos *o*-difenólicos con α - y β -CD, en los casos donde fue posible obtener ambos valores de la literatura.

En la tabla 13 también se especifican las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica en las que fueron obtenidas así como la fuente bibliográfica.

Tabla 13. Comparación entre los valores de las constantes de formación (K_f) para los complejos de inclusión de los compuestos *o*-difenólicos con α - y β -CD, obtenidos por otras técnicas.

Compuesto	CD	K_f (M^{-1})	pH	Fuerza iónica	Temperatura ($^{\circ}C$)	Técnica ^a	Referencia.
APTC	β	264	6.5	0.10	25	UV	[67]
ACAF	β	278	7.0	-	25	Fluorescencia	[44]
ACGN	β	597	6.5	0.10	25	UV	[67]
ACGN	β	646	6.5	0.05	25	UV	[67]
ACGN	β	522	6.5	1.40	25	UV	[67]
ACGN	β	799	6.5	0.10	3	UV	[67]
ACGN	β	526	3.6	0.10	25	UV	[67]
ACGN	β	424	7.0	-	25	Fluorescencia	[44]
ACGN	α	626	6.5	0.10	25	UV	[67]
ACGN	α	321	3.6	0.10	25	UV	[67]
ACGN	α	1144	6.5	0.10	3	UV	[67]

^a En el caso de la técnica de UV, la fuerza iónica se fijó con diferentes concentraciones de buffer de fosfatos, y acetatos según el valor de pH reportado. pH 6.5 fosfatos, pH 3.6 acetatos.

^b Los valores de constante de formación para los complejos de inclusión se determinaron mediante la mezcla de disoluciones acuosas de los compuestos huésped y de cada CD, en relación 1:10 respectivamente.

A pesar de que en este trabajo de tesis no se presenta el estudio de las constantes de formación de los complejos de inclusión a otros valores de temperatura, pH y fuerza iónica (aunque se realizará en un futuro como extensión al proyecto), resulta interesante observar el efecto de la modificación de dichos parámetros. Se observa que los valores de las constantes de equilibrio son altamente dependientes de la temperatura ya que al

augmentar esta magnitud, el valor de la constante decrece (de 799 M^{-1} a 3°C a 597 M^{-1} a 25°C para ACGN con β -CD), un decremento similar se observa también para el complejo con α -CD (Tabla 13). Esto puede explicarse debido a la mayor libertad del huésped para poder entrar y salir de la cavidad. Los datos de la Tabla 13, muestran que la fuerza iónica tiene un efecto menos importante sobre la magnitud de las constantes (de 597 M^{-1} a fuerza iónica (I) 0.1 a 522 M^{-1} a I=1.40 para ACGN con β -CD).

En el caso del pH, la variación de las constantes de equilibrio no puede ser predicha cualitativamente ya que para el complejo entre β -CD y AGCN, los valores no son afectados en gran medida (597 M^{-1} a pH 6.5 a 526 a pH 3.6), mientras que en el caso del complejo con α -CD, los valores de la constante se ven ampliamente modificados (de 626 M^{-1} para pH 6.5 a 321 M^{-1} para pH 3.6).

Como puede observarse en la tabla 12, los valores de K_f obtenidos experimentalmente por voltamperometría cíclica se encuentran en el mismo intervalo de magnitud que los valores reportados en la literatura mediante otras técnicas (Tabla 13), sin embargo la comparación directa de dichos valores no es posible debido a la diferencia de condiciones experimentales.

Entre las perspectivas de este trabajo está realizar la simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales y el uso de una técnica independiente, como la calorimetría, para estimar las constantes de formación de los complejos y de esta manera poder corroborar los valores obtenidos mediante la aplicación del método de Evans y *col.*

Capítulo 6.**Conclusiones.****Estudios en ausencia de Ciclodextrinas.**

- Mediante electrólisis a potencial controlado, se observó que el número de electrones intercambiados durante la electro-oxidación de los compuestos *o*-difenílicos difiere de 2, que es el valor esperado para la conversión de catecol a *o*-quinona lo que sugiere la presencia de reacciones acopladas (adiciones tipo Michael) sobre la quinona electrogenerada. La observación de que a menor impedimento estérico de los compuestos mayor es el número de equivalentes de electrones obtenidos en la electrólisis, apoya la presencia de dichas reacciones acopladas.
- Los voltamperogramas cíclicos de los compuestos *o*-difenílicos en ausencia de CD a todas las velocidades de barrido estudiadas muestran una señal anódica con su correspondiente señal catódica, lo que indica que la quinona electrogenerada es estable en la escala de tiempo de la voltamperometría cíclica, lo que no ocurrió en el caso de la electrólisis a potencial controlado, dada la escala de tiempo mayor.
- Se estudió mediante simulación digital las diferentes posibilidades mecanísticas para la oxidación de los compuestos *o*-difenílicos en ausencia de CD, siendo un mecanismo tipo ECEC el que proporcionó el mejor ajuste.
- Se observó experimentalmente la mayor facilidad de oxidación de los derivados cinámicos contra los derivados benzoicos, lo cual se explica debido a la mayor estabilización de densidad electrónica, en los derivados del ácido cinámico.
- Fue posible observar experimentalmente en términos de la magnitud de corriente normalizada a concentración (i_N) registrada en los voltamperogramas, la proporcionalidad inversa entre volumen molecular y coeficiente difusión.

Estudio en presencia de Ciclodextrinas.

- Se comprobó que bajo las condiciones experimentales utilizadas se da el fenómeno de inclusión entre el compuesto *o*-difenílicos y las CD's. Esto se puso de manifiesto por el desplazamiento de los potenciales de pico anódico y

catódico (menor tendencia a la oxidación) y la paulatina disminución de la corriente para ambas señales conforme se aumenta la concentración de CD.

- Los tres compuestos estudiados y con ambas ciclodextrinas presentan un excelente ajuste al modelo de Evans y colaboradores^[62,63], lo que nos permitió determinar las constantes de formación de los complejos de inclusión, considerando que la reproducibilidad de los experimentos es alta.
- En todos los casos se forman complejos de inclusión con estequiometría 1:1 con valores de K_f del orden 10^3 M^{-1} mostrando que la formación del complejo es un proceso favorable.
- Se encontró que los derivados del ácido cinámico, esto es, los ácidos cafeico y clorogénico, se asocian preferentemente con la α -CD, mientras que el ácido protocatecuico derivado del ácido benzoico presenta mayor afinidad con la β -CD considerando los valores de K_f para cada caso.

Capítulo 7.**Referencias.**

- [1] Syan B.; Astley, D. *Molecular Aspects of Medicine*. **23**, 1-38, (2002).
- [2] Martínez, G. *Revista Cubana de Farmacología*. **3**, 39-47, (2005).
- [3] Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon M. Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones Prácticas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 2001.
- [4] Madhavi, D.; Deshpande, S.; Salunkhe, D. Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives. Marcell Dekker, Inc. New York. 1996.
- [5] Deaton, C.M.; Marlin, D.J. *The Veterinary Journal*. **169**, 7-9, (2005).
- [6] Seifreid, H.A.; Anderson, D.E.; Fisher, E.I.; Milner, J.A. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **18**, 567-579, (2007).
- [7] Taylor, C.T. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **10**, 189-198, (2001).
- [8] Cadenas, E.; Lester, P. Handbook of Food Antioxidants. Marcell Dekker. Second edition. New York 2002.
- [9] Nolasco, A. E. Propiedades Antioxidantes de la α -Mangostina. Tesis de licenciatura (Química de Alimentos). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008.
- [10] Nordberg, J.; Arnér, S.J.E. *Free Radical Biology and Medicine*. **31**, 1287-1312, (2001).
- [11] Huheey, J.; Keiter, E.; Keiter, R. Inorganic Chemistry. Principles of Structure and Reactivity. Fourth edition. Harper Collins College Publishers. New York. 1993.
- [12] Cox, P.A. Inorganic Chemistry. Second edition. Bios Scientific Publishers. New York. 2004.
- [13] Xiong, Y.; Rabchesky, A.; Hall E.D. *Journal of Neurochemistry*. **100**, 639-649, (2007).
- [14] Nelson, D.; Cox, M. Lehninger. Principles of Biochemistry. Prentice Hall. Fourth edition. New York. 2004.
- [15] Caballero, B.; Trugo, L.; Finglas, P. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press. San Diego, California. 2003.
- [16] Lester, P.; Midori, H.; Toshikazu, Y. Antioxidant Food Supplements in Human Health. Academic Press. San Diego, California. 1999.
- [17] Lyengar, R.; McEvily, A.J. *Trends in Food Science and Technology*. **3**, 60-64. (1992).

-
- [18] Marshall, M. R.; Kim, J.; Wei, Cheng-I. (2000). Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods. Food Science and Human Nutrition Department University of Florida.
- [19] Kornsteiner, M.; Wagner, K.; Elmadfa, I. *Food Chemistry*. **98**, 381-387, (2006).
- [20] Marinova, E.M.; Nedyalka, V.Y. *Food Chemistry*. **81**, 189-197, (2003).
- [21] Kono, Y.; Kobayashi, K.; Tagawa, S.; Adachi, K.; Ueda, A.; Sawa, Y.; Shibata H. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1335**, 335-342, (1997).
- [22] Iwahashi, H.; Ishii, T.; Sugata, R. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **276**, 242-247, (1990).
- [23] Ohnishi, M.; Morishita, H.; Iwahashi, H.; Toda, S.; Shirataki, Y.; Kimura, M.; Kido, R. *Phytochemistry*. **36**, 579-583, (1994).
- [24] Mattila, P.; Hellstrom, J.; *Journal of Food Composition and Analysis*. **20**, 152-160, (2007).
- [25] Prakash, D.; Singh, B.M.; Upadhyay, G. *Food Chemistry*. **102**, 1389-1393, (2007).
- [26] Minussi, R.; Rossi, M.; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G.M.; Durán, N. *Food Chemistry*. **82**, 409-416, (2003).
- [27] Sujah, M. *Journal of Food Composition and Analysis*. **19**, 531-537, (2006).
- [28] Laranjinha, J.; Cadenas, E. *Life*, **48**, 57-65, (1999).
- [29] Martínez, M.V.; Whitaker, J.R.; *Trends in Food Science and Technology*. **6**, 195-200, (1995).
- [30] Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.C.; Lerici, C.R. *Trends in Food Science and Technology*. **11**, 340-346, (2001).
- [31] Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. *Nature Structural Biology*, **5**, 1084-1089, (1998).
- [32] Lyengar, R.; McEvily, A.J.; *Trends in Food Science and Technology*. **3**, 59-63, (1992).
- [33] He, Q.; Luo, Y.; Chen, P. *Food Chemistry*. **110**, 847-851, (2008).
- [34] Negishi, O.; Ozawa, T. *Phytochemistry*. **54**, 481-487, (2000).
- [35] Martínez-Álvarez, M.E.; López-Caballero, M.E.; Montero, P.; Gómez-Guillén, M.C. *Food chemistry*. **100**, 147-155, (2007)
- [36] Altunkaya, A.; Gokmen, V. *Food Chemistry*. **107**, 1173-1179, (2008).
- [37] Núñez-Delicado, E.; Serrano-Megías, M.; Perez-López, A.J.; López-Nicolás, J.M. *Food Chemistry*. **100**, 108-114, (2007).

- [38] Astray, G.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; González-Barreiro, C.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocolloids*. (2009). Artículo en proceso de aparición.
- [39] Martínez, Pujol, R. *Las ciclodextrinas y su importancia en la industria química*. Trabajo Monográfico de Actualización. Ingeniería Química. Facultad de Química. U.N.A.M. 2001.
- [40] Martin del Valle, E.M. *Process Biochemistry*. **39**, 1033-1046, (2004).
- [41] Szejtli, J. *Carbohydrate Polymers*. **12**, 375-392, (1990).
- [42] Cal, K; Centkowska, K. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **68**, 467-478, (2008).
- [43] Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U.C. *Biotechnology Advances*. **20**, 341-359, (2002).
- [44] Gornas, P.; Neunert, G.; Bacsynski, K.; Polewsky K. *Food Chemistry*. **114**, 190-196, (2009).
- [45] Castronouvo, G.; Niccoli, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **14**, 3886-3887, (2006).
- [46] Meier, M.; Luiz M.T.B.; Szpoganics, B.; Soldi, V. *Thermochimica Acta*. **375**, 153-160, (2001).
- [47] Rudolph, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **543**, 23-29, (2003).
- [48] Shao, Y.; Molnar, L.F.; Jung, Y.; Kussman, J.; Oschenfeld, C.; Brown, S.T.; Gilbert, A.T.B; Slipchenko, L.V.; O'Neill, D.P; DiStasio Jr., R.A; Lochan, R.C.; Wang, T.; Beran, G.J.O.; Besley, N.A.; Herbert, J.M.; Lin, C.Y.; Van Voorhis, T.; Chien, S.H.; Sodt, A.; Steele, R.P.; Rassolov, V.A.; Maslen, P.E.; Korambath, P.P.; Adamson, R.D.; Austin, B.; Baker, J.; Byrd, E.F.C.; Daschel, R.J.; Doerksen, R.J.; Dreuw, A.; Dunietz, B.D.; Dutoi, A.D.; Furlani, T.R.; Gwaltney, S.R.; Heyden, A.; Hirata, S.; Hsu, C-P.; Kedsiora, G.; Khalliullin, R.Z.; Klunzinger, P.; Lee, A.M.; Lee, M.S.; Liang, W.Z.; Lotan, I.; Nair, N.; Peters, B.; Proynov, E.I.; Pieniazek, P.A.; Rhee, Y.M.; Ritchie, J.; Rosta, E.; Sherril, C.D.; Simmonett, A.C.; Subotnik, J.E.; Woodcock III, H.L.; Zhang, W.; Bell, A.T.; Chakraborty, A.K.; Chipman, D.M.; Keil, F.J.; Warshel, A.; Hehre, W.J.; Schaefer, H.F.; Kong, J.; Krylov, A.I.; Gill and Head-Gordon, P.M.W. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **8**, 3172-3192, (2006).
- [49] Miao, W.; Ding, Z.; Bard, A. *Journal of Physical Chemistry B*. **106**, 1392-1398, (2002).
- [50] Paddon, C.; Silverstein, D.; Farrah, L. *Electroanalysis*. **19**, 11-22, (2007).
- [51] Kishioka, S.; Akifumi, Y. *Bioelectrochemistry*. **64**, 109-112, (2004).

- [52] Daniele, S.; Ugo, P.; Mazzocchin, G. *Analytica Chimica Acta*, **211**, 325-331, (1988).
- [53] Anson, F.C.; Osteryoung, R.A.; *Journal of Chemical Education*, **60**, 293-296, (1983).
- [54] Hotta, H.; Ueda, M.; Nagano, S.; Tsujino, Y.; Koyama, J.; Osakai, T. *Analytical Chemistry*, **303**, 66-72. (2002).
- [55] Chambers, J.Q. *Electrochemistry of Quinones, In The Chemistry of the Quinone Compounds*; Part 2, Chapter 14. Ed. S. Patai; John-Wiley & Sons, New York, 1974.
- [56] Erdemgil, F.Z.; Sanli, S.; Sanli, N.; Özkan, G.; Barbosa, J.; Guiteras, J.; Beltrán, J.L. *Talanta*. **72**, 489-496, (2007).
- [57] Beltrán, J.L.; Sanli, N.; Fonrodona, G.; Barrón, D.; Özkan, G.; Barbosa, J. *Analytica Chimica Acta*. **484**, 253-264, (2003).
- [58] De Boer, G.; Hanson, F.E. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **45**, 123-131, (1987).
- [59] Barbeau, W.E.; Kinsella, J.E.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **31**, 993-998, (1983).
- [60] Bard, A.; Faulkner, L. *Electrochemical Methods. Fundamentals and applications*. John and Wiley Sons. Inc. (1980).
- [61] Marcus, R.A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1111-1121, (1993).
- [62] Matsue, T.; Osa, T.; Evans D.H. *Journal of Inclusion Phenomena*, **2**, 547-553, (1984).
- [63] Matsue, T.; Osa, T.; Evans D.H.; N. Kobayashi. *Journal of American Chemical Society*, **107**, 3411-3416 (1985).
- [64] Gao, Z-N.; Wen, X.-L.; Li, H.-L. *Polish Journal of Chemistry*, **76**, 1001-1007, (2002).
- [65] X-J. Dang, J. Tong and H.-L. Li, *Journal of Inclusion Phenomena*, **24**, 275-283, (1996).
- [66] Strazisar, M.; Andrensek, S.; Smidovnik, A. *Food Chemistry*. **110**, 636-642, (2008).
- [67] Irwin, P.; Pfeffer, P.; Doner, L.; Sapers, G.; Brewster, J.; Nagahashi, G.; Hicks, K. *Carbohydrate Research*, **256**, 13-27, (1994).
- [68] Irwin, L.P.; King, G.; Hicks, K. B. *Carbohydrate Research*. **282**, 65-79, (1996).
- [69] Marcus, R.A. *Discuss. Farad. Soc*, **29**, 21-31, (1960)
- [70] Marcus, R.A.; *J. Phys. Chem.*, **67**, 853-857, (1963).

- [71] Marcus, R.A. *J. Chem. Phys.* **43**, 679-688, (1965)
- [72] Bard, A.J.; Stratmann, M.; Calvo, E.J. *Encyclopedia of Electrochemistry*. Volume 2. Interfacial Kinetics and Mass Transport. Wiley –VCH. New York. 2003.
- [73] Engel, T.; Reid, P. *Introducción a la Fisicoquímica: Termodinámica*. Pearson/Addison Wesley. México 2007.
- [74] Levine, Ira. N. *Fisicoquímica*. Volumen 2. Quinta edición. Mc Graw Hill. México. 2004.
- [75] http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm341/lecture_set8/The%20Marcus%20Theory%20of%20Electron%20Transfer.pdf. Página de la Universidad Estatal de Arizona, E.U.A.
- [76] <http://www.mit.edu/~tokmakof/TDQMS/Notes/12.2.%20Marcus.pdf>. Página del MIT, E.U.A.
- [77] Andreia, M. Marcus Theory for Electron Transfer a Short Introduction. Obtenido de: http://www.mpip-mainz.mpg.de/~andrienk/journal_club/marcus.pdf. Página del Instituto Max Planck, Alemania.
- [78] Marcus R.A. Nobel Lectures of Chemistry. Obtenido de http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1992/marcus-lecture.html
- [79] Compton, R.G.; Banks, C. *Understanding Voltammetry*. World Scientific Publishing. UK. 2007.
- [80] Gosser, D.K. *Cyclic Voltammetry. Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. V.S.H Publishers. New York. 1993.
- [81] Kissinger, P.T.; Heineman, W.R.; *Journal of Chemical Education*. **60**, 702-706, (1983).
- [82] Evans, D.H.; O'Connell, K.M.; Petersen, R.A.; Kelly, M.J. *Journal of Chemical Education*. **60**, 290-293, (1983).
- [83] Mabbot, G.A. *Journal of Chemical Education*. **60**, 697-701, (1983).
- [84] http://www-biol.paisley.ac.uk/marco/Enzyme_Electrode/Chapter1/Cyclic_Voltammetry1.htm. Página de la University of Paislev. United Kingdom.

ANEXO A ^[60, 69-73].

Fundamentos de Electroquímica y Cinética Electroquímica.

Las reacciones químicas ocurren cuando se da un suministro adecuado de energía al sistema, produciéndose un reacomodo y/o formación de nuevos enlaces entre los átomos que conforman reactivos, para originar productos. En un gran número de ocasiones los reactivos difieren de los productos solamente en una partícula, que puede ser cedida o ganada durante la reacción, como ocurre en las reacciones de complejación, ácido-base y redox, siendo esta última clase de reacciones donde aparece la electroquímica como una herramienta invaluable, no sólo para obtener información de transferencias electrónicas entre reactivos y productos, sino también información termodinámica y cinética de estos procesos.

La electroquímica se define^[55,74] como la disciplina que estudia la relación de la electricidad con las reacciones químicas y se estudia primordialmente en celdas electroquímicas, que son una colección de interfases conductoras inteligentemente colocadas en base a reactividad y el fenómeno a estudiar. En las celdas electroquímicas se estudia la interacción existente entre un analito presente en una fase conductora y un electrodo, es por ello que la electroquímica es una ciencia de tipo interfacial, ya que es justamente en la interfase electrodo-solución donde se llevan a cabo las transferencias electrónicas hacia los reactivos o hacia el electrodo en función del potencial eléctrico aplicado. La estructura de la interfase electrodo-solución es bastante compleja, sin embargo se puede esquematizar de acuerdo a la Figura 41, donde puede observarse que alrededor de la superficie cargada del electrodo se ha formado una doble capa, donde coexisten cationes solvatados, moléculas de disolventes y ciertas especies adsorbidas en la superficie metálica, además se distinguen dos regiones: el plano interno de Helmholtz (IHP) y el plano externo (OHP).

La facilidad con la que se lleva a cabo una transferencia electrónica del analito a la superficie conductora del electrodo, dependerá de la naturaleza del analito, y del producto que se forma además del acoplamiento de los estados del metal con respecto a los estados electrónicos del analito (Figura 42).

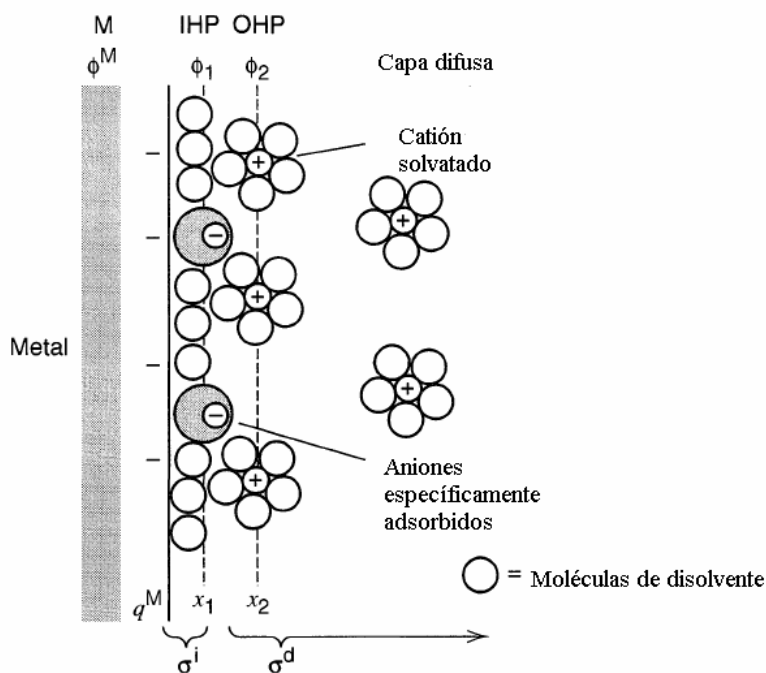


Figura 41. Tomada de [53]. Modelo propuesto para la región de la doble capa bajo condiciones donde los aniones se encuentran específicamente adsorbidos.

En electroquímica el flujo de portadores de carga ya sea del electrodo a la disolución o viceversa, genera como respuesta una corriente (i), la cual se define como la cantidad de carga (q) que fluye por unidad de tiempo (t). (Ecuación (69))

$$i = \frac{dq}{dt} \quad (69)$$

La unidad empleada para la corriente de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades (SI) es el Ampere (A), que se define como $C s^{-1}$, cuando la carga y el tiempo se expresan en estas unidades.

De acuerdo a la naturaleza de la corriente que se observa en un experimento se pueden definir dos tipos de procesos:

- a) Procesos no Faradaicos.
- b) Procesos Faradaicos.

Los procesos no faradaicos son aquellos donde existen fluctuaciones de corriente, que no son asociadas a la oxidación o reducción de algún analito, como los procesos de cargado¹ que ocurren debido a la doble capa formada en la interfase electrodo-solución, o a procesos de adsorción/desorción.

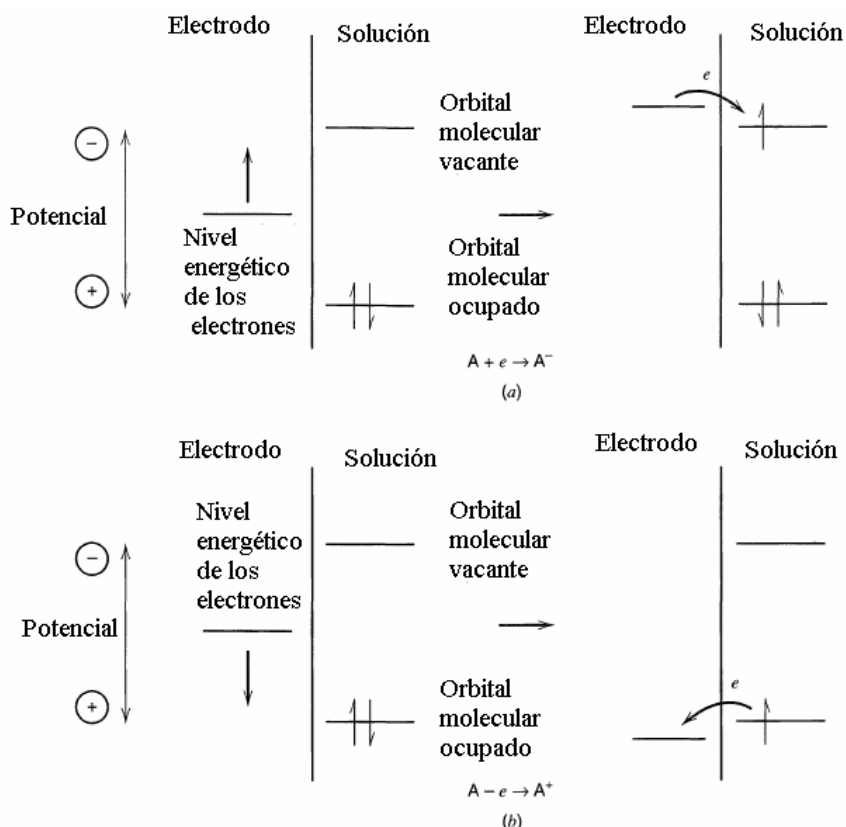


Figura 42. Tomada de [60]. Esquema representativo de a) reducción, b) oxidación de la especie A. El sistema que se encuentra aquí ilustrado podría representar un compuesto aromático (por ejemplo 9,10-difenilantraceno) en un disolvente aprótico (como acetonitrilo) frente a un electrodo de trabajo de platino. El proceso redox, se lleva a cabo mediante la variación del potencial (E) del electrodo con respecto a la disolución, lo que provoca que la transferencia se lleve hacia un lado o hacia el otro.

Los procesos faradaicos (Figura 42) son aquellos en los que la corriente observada se debe a la oxidación o reducción de un analito, y por ende obedecen a las Leyes de Faraday (Ecuación (48)), la cual relaciona la cantidad de carga por mol de sustancia

¹ El arreglo que existe entre la doble capa y un capacitor es similar, es por ello que en los experimentos de voltamperometría (variación del potencial con respecto a la corriente, Anexo B) se registra cierta corriente de cargado, análoga a la que se presenta en los circuitos eléctricos que se encuentran capacitados.

reaccionante (Fundamento de las medidas de electrolisis a potencial controlado Anexo B).

$$Q=nN_0F \quad (48)$$

Donde Q es la carga, N_0 el número de moles de sustancia electrolizada y n el número de partículas portadoras de carga cedidas o aceptadas y F es la constante de Faraday 96487 C/mol.

La velocidad de las reacciones puede estar limitada por varios factores, por ejemplo:

- a) Reacciones químicas que antecedan o precedan la transferencia electrónica.
- b) Transporte de masa que es el movimiento de material desde un punto hasta otro dentro del sistema debido a diferentes modos de transporte originados por diferencias en el potencial eléctrico (migración), potencial químico (difusión) o en el desplazamiento de volúmenes de disolución ya sea por agitación o gradientes de densidad (convección).

La ecuación (70) recibe el nombre de ecuación de Nernst-Planck y describe el flujo de material ($J_j(x)$) de una zona a otra de la disolución (en este caso de manera unidimensional) considerando cada uno de los tres modos de transporte: Difusión (primer término), migración (segundo término) y convección (tercer término), respectivamente.

$$J_j(x) = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_j v^*(x) \quad (70)$$

En este caso $J_j(x)$ como ya se mencionó corresponde al flujo expresado usualmente en unidades de $\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, D_j es el coeficiente de difusión (cm^2/s), $\frac{\partial C_j(x)}{\partial x}$ corresponde

al gradiente de concentración a una distancia x de la superficie del electrodo, $\frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$ es el gradiente de potencial eléctrico, C_j y z_j son la concentración y carga de las especie j respectivamente y $v^*(x)$ (cm/s) la velocidad a la cual un volumen de disolución se mueve a lo largo del eje x .

Considerando que en las condiciones experimentales ideales para realizar la voltamperometría cíclica se anulan los términos de convección (disolución en reposo y temperatura controlada) y migración (gran exceso de electrolito soporte), es evidente que el fenómeno que describirá el transporte de masa empleando electrodos estacionarios es la difusión. Por lo que la ecuación (ecuación (71)) de flujo se reduce a:

$$J_j(x) = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} \quad (71)$$

Hasta este momento ha sido estudiada la manera en la que el flujo se modifica en función de la distancia, sin embargo en los experimentos electroquímicos otra variable fundamental es el tiempo, por lo que se necesita una descripción del flujo difusional teniendo en cuenta esta variable. Las leyes que definen este comportamiento se denominan leyes de Fick ecuaciones (72) y (73).

$$-J_0(x,t) = D_0 \frac{\partial C_0(x,t)}{\partial x} \quad (72)$$

$$\frac{\partial C_0(x,t)}{\partial t} = D_0 \left(\frac{\partial^2 C_0(x,t)}{\partial x^2} \right) \quad (73)$$

La primera ley de Fick (ecuación (72)) establece que el flujo es proporcional al gradiente de concentración. En este caso el flujo expresado como $J_0(x,t)$ es la velocidad neta de transferencia de masa de una sustancia por unidad de tiempo y de área, además note el signo negativo que indica la oposición del flujo al incremento del

gradiente. La ecuación (73) recibe el nombre de segunda ley de Fick y puede ser derivada a partir de la primera ley. La segunda ley nos permite conocer la variación en la concentración de una especie en función del tiempo, adicionalmente la resolución de esta ecuación nos permite conocer los perfiles de concentración, un concepto muy útil que se revisará en el siguiente anexo en la parte de voltamperometría cíclica.

El tratamiento microscópico de la difusión^[73] parte de considerar el movimiento aleatorio de las moléculas reaccionantes en disolución (movimiento browniano), donde el análisis estadístico de la posición de una partícula nos conduce a la ecuación (74).

$$\hat{x} = \sqrt{2Dt} \quad (74)$$

Donde \hat{x} es el desplazamiento promedio de la molécula, D es el coeficiente de difusión y t es el tiempo. La ecuación (74) permite a groso modo estimar el ancho de la capa de difusión a diversos tiempos, una vez que se conoce el coeficiente de difusión.

El movimiento al que se encuentra sujeta una partícula dentro de un disolvente se encuentra dirigido por las colisiones con las partículas del líquido, al realizar un análisis de fuerza y considerar la difusión unidimensional es fácil observar que el movimiento de la partícula producirá una fuerza friccional ($F_{fr,x}$) debida a la viscosidad (η^*) del medio, es por ello que la fuerza total ($F_{total,x}$) sobre la partícula es simplemente la suma de las fuerzas colisional ($F_x(t)$) y friccional, ecuación (75) o su forma desarrollada la ecuación (76).

$$F_{total,x} = F_x(t) + F_{fr,x} \quad (75)$$

$$m \left(\frac{d^2x}{dt^2} \right) = F_x(t) - f \left(\frac{dx}{dt} \right) \quad (76)$$

Donde m es la masa de la partícula y f el coeficiente de fricción que es dependiente del tamaño y geometría de la partícula.

Einstein estudió esta ecuación diferencial en 1905, demostrando que cuando se promedia para numerosas colisiones de partículas de fluido, el desplazamiento cuadrático promedio (\hat{x}^2) viene dado por la ecuación (77).

$$\hat{x}^2 = \frac{2k_B T t}{f} \quad (77)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura y f el coeficiente de fricción que para partículas esféricas se encuentra dado por la ecuación (78).

$$f = 6\pi\eta^*r \quad (78)$$

Donde η^* es la viscosidad y r es el radio de la molécula.

Sustituyendo la ecuación (78) en (77) obtenemos la ecuación (79).

$$\hat{x}^2 = 2 \left(\frac{k_B T}{6\pi\eta^*r} \right) t \quad (79)$$

En la ecuación (79), el término entre paréntesis es el coeficiente de difusión (ecuación (80)), esta ecuación establece que el coeficiente de difusión de una partícula depende de la viscosidad del medio, el tamaño de la partícula, y la temperatura.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta^*r} \quad (80)$$

c) Transferencia electrónica. Cinética electroquímica.^[69-72]

La transferencia electrónica es uno de los procesos químicos más relevantes en la naturaleza debido al importante papel que desempeña en muchos procesos físicos, químicos y biológicos, por ejemplo la generación de ATP y la fotosíntesis.

La cinética de los procesos de transferencia de electrones puede ser estudiada, según dos tipos de enfoque:

- a) Enfoque macroscópico: Ecuación de Butler-Volmer, Diagramas de Taffel.
- b) Enfoque microscópico: Teoría de Marcus.

Empecemos con el enfoque macroscópico. Cuando un electrodo está en su potencial reversible existe un equilibrio entre las formas oxidada y reducida del sistema. Este equilibrio se puede representar mediante la ecuación (81):



Considerando la reacción (81) como de primer orden se tiene que la velocidad de reacción queda descrita por las ecuaciones (82)- (84); donde v_f y v_b corresponden a la velocidad de la reacción directa e inversa, k_f y k_b son las correspondientes constantes de rapidez de la reacción y $C^*[O]$ y $C^*[R]$ corresponden a la concentración del oxidante y reductor en el seno de la disolución.

$$v = v_f - v_b \quad (82)$$

$$v_f = k_f C^*[O] \quad (83)$$

$$v_b = k_b C^*[R] \quad (84)$$

La velocidad total de la reacción (Ecuación (85)) se sabe que es igual a la razón de la corriente entre la constante de Faraday²:

$$v = v_f - v_b = \frac{i}{F} \quad (85)$$

² Esta deducción proviene del hecho de considerar la ecuación de Faraday (**Ecuación (48)**) que relaciona la cantidad de moles transformados por unidad de carga eléctrica.

De acuerdo a la Teoría del Complejo Activado, las constantes de rapidez (ecuación (86)) se expresan como:

$$k_i = \frac{k_B T}{h} \kappa e^{-\frac{\Delta G_i^\ddagger}{RT}} \quad (86)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, h la constante de Planck, R la constante de los gases, T la temperatura, κ se conoce como factor de transmisión y representa la probabilidad de que los reactivos se transformen en productos, por último ΔG_i^\ddagger corresponde a la energía libre del complejo activado, que puede dividirse en una parte dependiente y otra independiente del potencial tanto para el proceso directo como para el proceso inverso, ecuaciones (87) y (88) respectivamente.

$$\Delta G_f^\ddagger(E) = \Delta G_f^\ddagger(E_e) + \alpha FE \quad (87)$$

$$\Delta G_b^\ddagger(E) = \Delta G_b^\ddagger(E_e) - (1-\alpha)FE \quad (88)$$

Donde α en este caso es la fracción de potencial aplicado (coeficiente de transferencia), que nos da una medida de la asimetría en la barrera energética en los diagramas de energía libre para las reacciones redox (Figura 43). Por lo que la curva de la energía libre se ve sumamente afectada por el potencial.

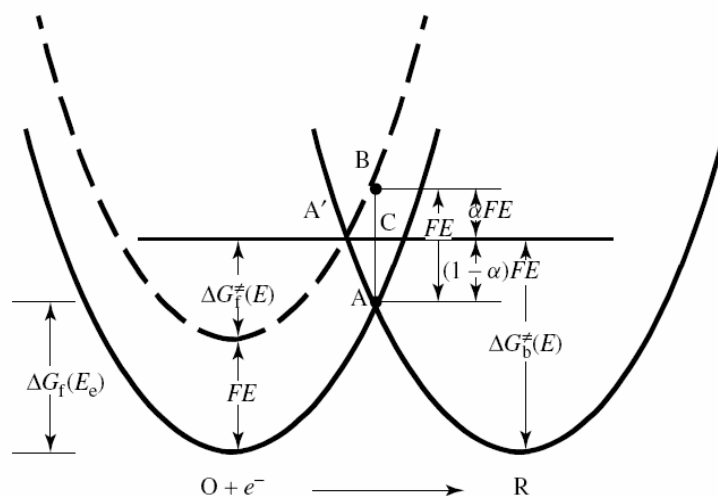


Figura 43. Tomada de [72]. Representación esquemática del efecto del potencial del electrodo en la energía libre (ΔG) versus las curvas de coordenadas de reacción, para un sistema monoelectrónico a dos potenciales. $E = E_e$ (línea sólida) y $E < E_e$ (línea discontinua).

Si se considera todo lo anteriormente expuesto es posible obtener las constantes de velocidad en función de la energía libre, α y del potencial de equilibrio (E_e), con lo que se llega a las ecuaciones (89) y (90).

$$k_f = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G_f^\ddagger(E_e)}{RT}} e^{-\frac{-\alpha FE}{RT}} \quad (89)$$

$$k_b = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G_b^\ddagger(E_e)}{RT}} e^{-\frac{(1-\alpha)FE}{RT}} \quad (90)$$

Si se define la parte química como constante (primer término exponencial y lo que se encuentra del lado izquierdo), y se denomina $k_{f,0}$ y $k_{b,0}$ respectivamente y si se considera adicionalmente la velocidad total en términos de la corriente (ecuación (85)), se obtiene la ecuación (91).

$$i = F \left[k_{f,0} C_O^* e^{-\frac{-\alpha FE}{RT}} - k_{b,0} C_R^* e^{-\frac{(1-\alpha)FE}{RT}} \right] \quad (91)$$

Donde C_O^* y C_R^* corresponden a las concentraciones en el seno de la disolución.

Por último si se considera la corriente de intercambio (i_0) en la ecuación (91), se obtiene la ecuación de Butler-Volmer (Ecuación (92)).

$$i = i_0 \left(e^{\frac{-\alpha F \eta}{RT}} - e^{-\frac{(1-\alpha)F \eta}{RT}} \right) \quad (92)$$

La ecuación de Butler-Volmer relaciona la corriente con dos parámetros cinéticos muy importantes:

- α : Da la simetría de las curvas de energía libre, e indica la fracción del potencial que ayuda a la reacción catódica y la fracción $(1-\alpha)$ es la fracción de potencial que favorece la reacción anódica.
- i_0 : Altura de la barrera de energía y valor de la corriente cuando el sistema se encuentra en equilibrio ($\eta = 0$)

Uno de los primeros aciertos de esta ecuación fue dar una relación cuantitativa de los resultados de Tafel quien en 1905 observó (ecuación (93)) que la corriente se encontraba relacionada exponencialmente al sobrepotencial (η)³.

$$\eta = a - b \log(i) \quad (93)$$

Si se arregla de manera distinta la ecuación de Butler-Volmer (ecuación (94)) se llega a una forma de la ecuación de Tafel.

$$\eta = \frac{2.303aRT}{\alpha F} \left[-\log \left(\frac{i}{1 - e^{-\frac{F\eta}{RT}}} \right) + \log(i_0) \right] \quad (94)$$

Una vez que ha sido estudiado el enfoque macroscópico con la ecuación de Butler-Volmer es momento de abordar la teoría de Marcus, que posee una indudable importancia dada su utilidad para elucidar una gran variedad de problemas y por ser el primer tratamiento íntegro que trató de explicar este tipo de fenómenos de transferencia de electrones a nivel microscópico.

-Teoría de Marcus de transferencia de electrones^[69,70,75-78].

La teoría de Marcus surgió del interés de estudiar las reacciones de intercambio isotópico, que son aquellas descritas por la reacción (95), donde * denota un isótopo radioactivo, y que desde el punto de vista químico son las reacciones más sencillas que existen, debido a que no se rompe ningún enlace químico en el proceso.

³ El sobrepotencial η se refiere a la desviación del potencial de equilibrio con respecto al potencial aplicado.



Para desarrollar su teoría Marcus partió del hecho de considerar al disolvente como un medio dieléctrico continuo, considerando que la transferencia electrónica depende en gran medida de la disposición de los dipolos del disolvente que solvata al analito antes y después de la transferencia electrónica (Figura 44), debido a que la velocidad con la que se transfieren los electrones es mucho mayor a la velocidad con la que el núcleo percibe este cambio, y por ende si consideramos la reacción (95) el $*Fe^{2+}$ recién formado a partir de $*Fe^{3+}$ se encontrará momentáneamente (hasta que ocurra un rearrreglo de los dipolos) en un entorno de solvatación que era favorable para el $*Fe^{3+}$, por lo que aparece de manera natural en este tipo de equilibrios un término energético que se relaciona con la solvatación.

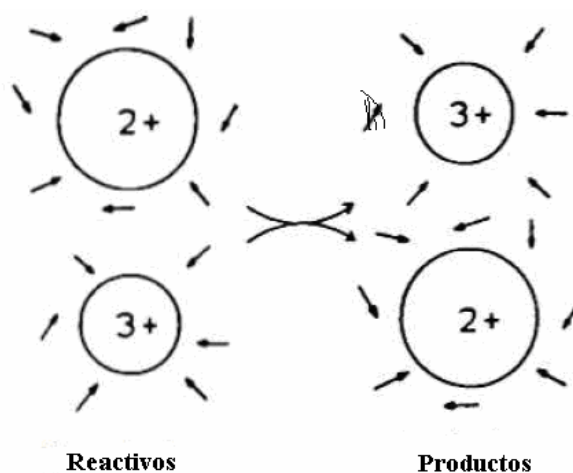
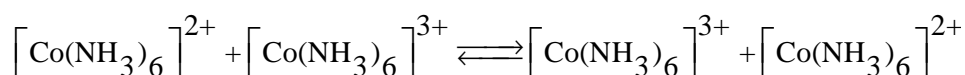


Figura 44. Efecto de los dipolos del disolvente, sobre reactivos y productos durante una reacción de transferencia electrónica, en un intercambio isotópico.

La diferencia en la energía de solvatación, no es el único término de importancia en las reacciones de transferencia electrónica, ya que en las reacciones de intercambio isotópico de iones más complejos, es necesario considerar el cambio en las coordenadas vibracionales que ocurre al pasar de un estado de oxidación a otro, como en el caso del enlace Co-N, en la reacción (96).



(96)

Es por ello que Marcus describió el término λ , que se conoce como energía de reorganización, y que se define como la cantidad de energía requerida para pasar de la configuración nuclear de reactivos a productos. La energía de reorganización se divide en dos contribuciones una de solvatación (λ_0) y otra vibracional (λ_1). Ecuación (97).

$$\lambda = \lambda_0 + \lambda_1 \quad (97)$$

El término correspondiente a la solvatación se puede representar mediante la ecuación (98), que es válida sólo cuando se considera un modelo de esferas.

$$\lambda_0 = (\Delta e)^2 \left(\frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} + \frac{1}{R} \right) \left(\frac{1}{\epsilon_{OP}} - \frac{1}{\epsilon_S} \right) \quad (98)$$

Donde a_1 es el radio de la esfera donadora de carga, a_2 el radio de la esfera que acepta la carga. R es la distancia entre los centros de los reactantes y ϵ corresponde a los coeficientes dieléctricos óptico y estático respectivamente. Δe es la carga transferida de un reactivo a otro cuando ocurre la reacción. El término que involucra a los coeficientes ópticos se relaciona con el hecho que los grados de libertad de los núcleos no se pueden reajustar instantáneamente al movimiento de los electrones transferidos.

La otra parte de la energía libre de reorganización (energía vibracional) se expresa de acuerdo a la ecuación (99).

$$\lambda_1 = \sum_l \lambda_{1,l} = \frac{1}{2} \sum_j k_l (\Delta q_{e,l})^2 \quad (99)$$

Donde la suma se realiza en todas las vibraciones intramoleculares acopladas. La contribución del n -ésimo modo normal a la energía de reorganización se encuentra dado en términos de la constante de fuerza k , y del cambio en las posiciones de equilibrio entre los reactantes y productos, es decir $\Delta q_{e,l} = q_{p,R} - q_{p,P}$.

La constante de velocidad en la teoría de Marcus (ecuación (100)) se expresa como:

$$k^{\circ} = A e^{-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{k_B T}} \quad (100)$$

Donde A es un factor exponencial que depende de la naturaleza de la transferencia electrónica, por ejemplo que sea de tipo bimolecular o intramolecular, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y ΔG^{\ddagger} es la energía de activación en el estado de transición, que se define por la ecuación (101), que depende de λ y del sobrepotencial aplicado ($E-E^{\circ}$).

$$\Delta G_i^{\ddagger} = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{F(E-E^{\circ})}{\lambda} \right)^2 \quad (101)$$

El valor máximo de la constante de transferencia de electrones ocurre cuando la energía libre es igual y opuesta a la energía de reorganización.

La teoría de Marcus adicionalmente predice una dependencia no lineal del coeficiente de transferencia de electrones con respecto al potencial aplicado (Ecuación (102)), lo que difiere en gran medida de lo que se espera al emplear el modelo de Butler-Volmer.

$$\alpha = \frac{1}{F} \frac{\partial \Delta G_i^{\ddagger}}{\partial E} = \frac{1}{2} + \frac{F(E-E^{\circ})}{2\lambda} - \left(\frac{\omega_0 - \omega_R}{2\lambda} \right) \quad (102)$$

Donde w_o y w_R son los términos de trabajo electroestático, debido al trabajo eléctrico necesario para transportar reactantes cargados al sitio de reacción o transportar un reactante cargado cerca de la superficie cargada del electrodo respectivamente.

Anexo B.

Fundamento de las técnicas y mecanismos de reacción.

B.1 Voltamperometría cíclica^[60,79-84].

B.1.1 Teoría y fundamentos de la técnica

En la actualidad la voltamperometría cíclica se ha convertido en una herramienta vital para el estudio de toda clase de sistemas donde se llevan a cabo reacciones de transferencia de electrones. Debido a la sencillez con la que se obtienen los datos experimentales y la gran versatilidad de la técnica ha encontrado aplicación en diversos campos de la química ya sea por sí misma o acoplada a otra técnicas. La voltamperometría cíclica, nos permite conocer las propiedades cinéticas como termodinámicas de la reacción de interés, además de información sobre las reacciones acopladas que pudieran estar afectando el equilibrio redox principal, es por todo lo anterior que la voltamperometría cíclica se usa regularmente como un estudio preliminar antes de emplear cualquier otra técnica electroquímica.

La voltamperometría cíclica requiere del uso de potenciostatos, que son aparatos que nos permiten controlar el potencial que aplicamos a la celda electroquímica, la cual consiste de tres electrodos. Este arreglo presenta la ventaja de disminuir los errores en el voltaje aplicado debido a la caída óhmica (Figura 45).

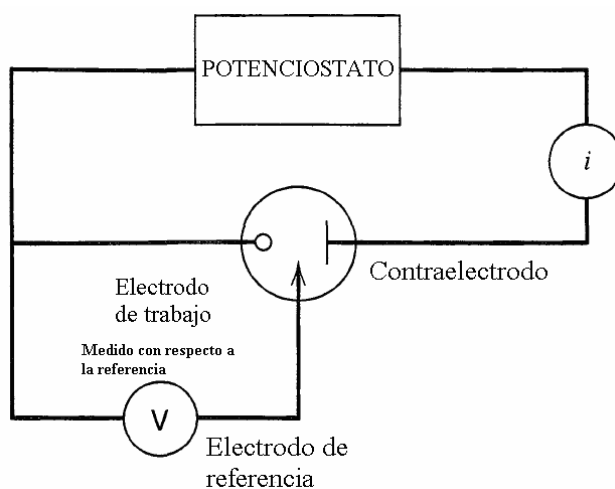


Figura 45. Adaptado de [60] Arreglo de tres electrodos de los equipos electroquímicos modernos.

El electrodo de trabajo es el electrodo en el cual se lleva a cabo la reacción de interés, los hay de distintas formas, áreas y materiales y la elección del mismo depende de las características del sistema en estudio y del intervalo de potencial en el que se va a trabajar. El electrodo de referencia es aquel electrodo con respecto al que se fija el potencial del electrodo de trabajo, idealmente los electrodos de referencia deben cumplir con ciertas características como son ser reversible y mantener su potencial constante ante el flujo de pequeñas corrientes. Los electrodos de referencia más comunes son el electrodo de calomel saturado (ECS) y el de Ag/AgCl. El tercer electrodo es el auxiliar o contraelectrodo el cual provee la corriente que necesita el electrodo de trabajo y evita que pasen grandes cantidades de corriente a través del electrodo de referencia. El contraelectrodo es usualmente un alambre de platino enrollado de gran superficie.

La voltamperometría consiste en realizar un barrido de valores potencial impuestos al electrodo de trabajo, desde un potencial inicial (E_i) donde no se lleva a cabo ninguna reacción de transferencia de electrones hacia una dirección ya sea positiva o negativa (con respecto a E_i) con el fin de oxidar o reducir al analito de interés, la respuesta obtenida es una corriente. El barrido de potencial se lleva a cabo hasta un punto que se conoce como potencial de inversión (E_λ), que es el potencial donde se realiza el barrido inverso de nuevo hacia E_i . Gráficamente estos barridos corresponden a una señal triangular de potencial en función del tiempo ($E=E(t)$) donde la pendiente de estos gráficos corresponde a la velocidad de barrido (v) que se expresa por lo general en V/s (Figura 46). La ecuación (103) corresponde a la expresión matemática para la recta del barrido directo y la ecuación (104) a la expresión para el barrido inverso.

$$E = E_i - vt \text{ válida para } 0 > t < \lambda^* \quad (103)$$

$$E = E_i - 2v\lambda^* + vt \text{ válida para } t > \lambda^* \quad (104)$$

Donde λ^* corresponde al tiempo en el cual se realiza el barrido inverso.

La velocidad de barrido es un parámetro muy importante ya que nos permite observar la presencia de reacciones químicas acopladas a la reacción redox de interés y qué tan rápido se llevan estos a cabo con respecto al equilibrio principal, además v se encuentra

íntimamente relacionada con la magnitud de corriente observada como respuesta en voltamperometría cíclica tal y como se describirá más adelante.

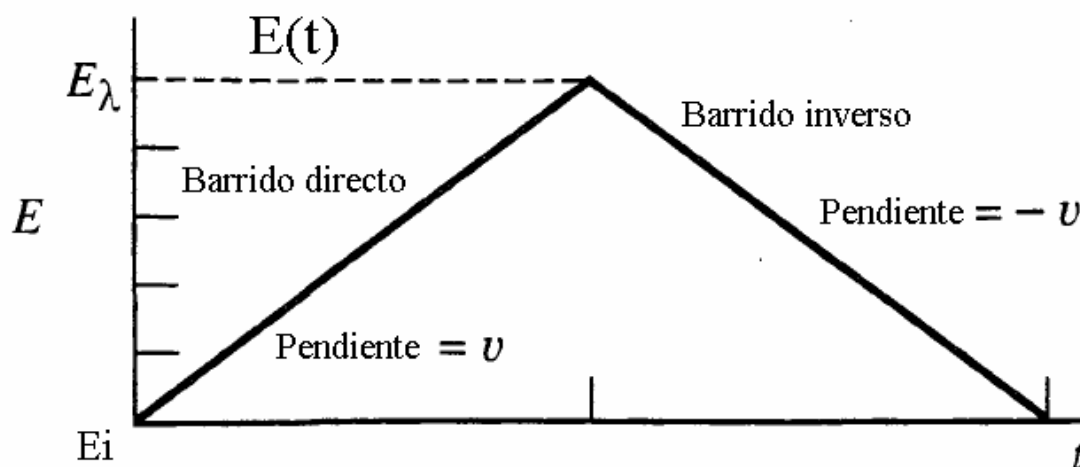


Figura 46. Adaptado de [80] Representación gráfica de la variación del potencial en los experimentos de voltamperometría cíclica.

En voltamperometría cíclica la corriente se grafica en función del potencial aplicado ($i = i(E)$) obteniéndose de este modo un gráfico que recibe el nombre de voltamperograma. La figura 47 muestra el voltamperograma que se obtiene para la reducción de ferricianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, FICN) a ferrocianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, FOCN) donde el electrón transferido corresponde al átomo de hierro. (Ecuación (105)).



El punto a en la figura 48 corresponde al potencial inicial (E_i), que es un potencial en el cual no se lleva a cabo el equilibrio de la reacción (105) ni tampoco cualquier otra reacción de transferencia de electrones, por ende la corriente es cero.¹ A partir de E_i se hace un barrido de potencial en la dirección negativa, hasta que llega el momento en el que el potencial se ha vuelto lo suficiente negativo como para que se inicie la reducción de FICN, por lo que la corriente se vuelve distinta de cero (corriente catódica ó i_c) y i_{pc} aumenta exponencialmente conforme el potencial se vuelve más negativo como se observa en los puntos b y c, de tal manera que se satisface la ecuación de Nernst (ecuación (106)).

¹ En este caso se considera la corrección por la contribución de la corriente capacitiva. (ver más adelante en el texto).

$$E = E^{\circ'}_{\text{FICN/FOCN}} + \frac{RT}{nF} \log \frac{\text{FICN}}{\text{FOCN}} \quad (106)$$

Donde $E^{\circ'}$ es el potencial formal de reducción a las condiciones del experimento para el par FICN/FOCN, R es la constante de los gases, T la temperatura, F la constante de Faraday y n es el número de electrones intercambiados en la reacción, que en este caso es 1.

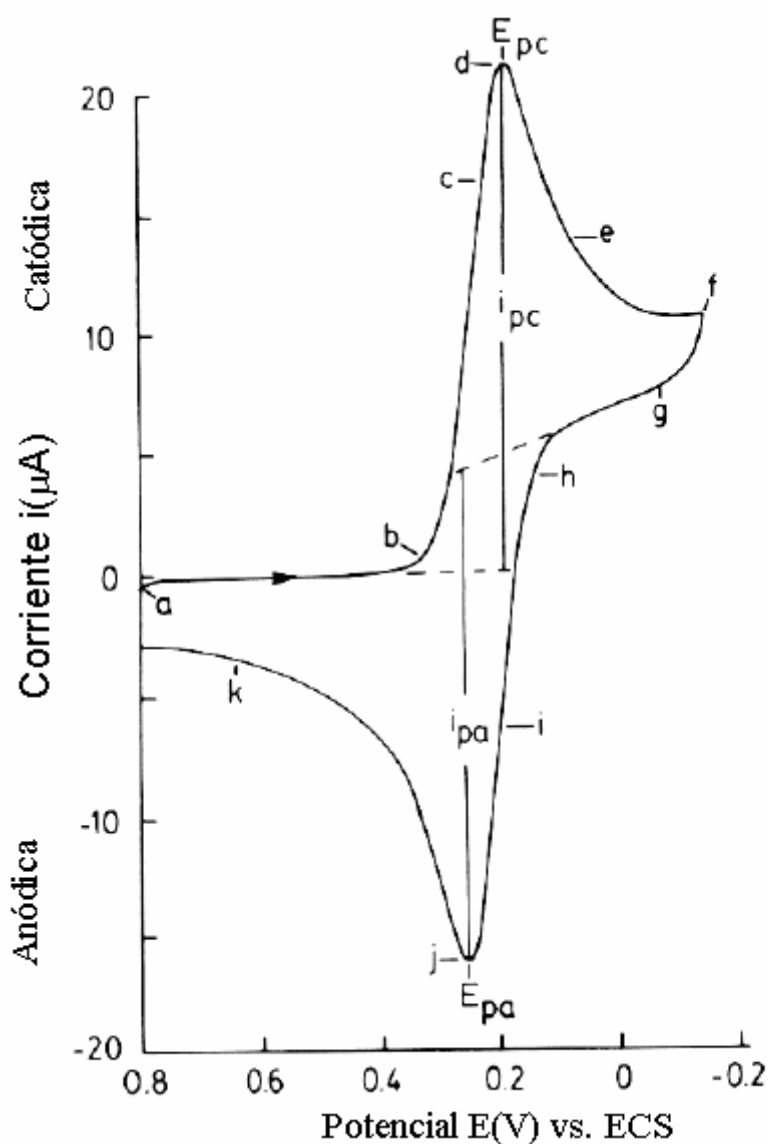


Figura 47. Adaptada de [81]. Voltamperograma cíclico de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 6 mM en 1M de KNO_3 . El barrido se inició a 0.8 V vs. ECS en dirección negativa a $v=50\text{ mV/s}$, en un electrodo de platino de 2.54 mm^2 de área.

La ecuación de Nernst indica que para cada potencial existe definida una relación de concentraciones de la especie oxidante (FICN) frente a la especie reductora (FOCN), por lo que al variar el potencial se modifica esta relación, a medida que el potencial se hace más negativo tiene lugar la transferencia electrónica para formar a partir de FICN la especie reducida FOCN, lo que se refleja en un aumento de la corriente catódica. El punto d corresponde a un máximo de corriente, dicho valor recibe el nombre de corriente de pico catódico (i_{pc}), y el potencial al que esto ocurre se denomina potencial de pico catódico (E_{pc}). A partir del punto d la corriente decrece (puntos d-e-f) a razón de $t^{1/2}$ y se vuelve independiente del potencial aplicado debido a que la especie oxidante (FICN) se ha agotado en las cercanías de la superficie del electrodo con lo que la electrólisis se ve limitada por la velocidad a la que llega más FICN que pueda reducirse a FOCN y se dice entonces que el proceso se encuentra dominado por difusión. El potencial señalado por el punto f se conoce como potencial de inversión (E_{λ}) y es el potencial de retorno hacia E_i . En el caso de los puntos g, h e i ocurre lo mismo que para los puntos b y c solo que la corriente observada (corriente anódica, i_a) corresponde a la oxidación de FOCN para regenerar el FICN de partida, en el punto j, la concentración de FOCN en la superficie del electrodo es cero recibiendo la corriente y potencial registrados en este punto el nombre de potencial de pico anódico (E_{pa}) y corriente de pico anódico (i_{pa}), respectivamente. Una vez más en el punto k la corriente observada es independiente del potencial aplicado pero dependiente de $t^{1/2}$, llegando así al potencial de inicio y con ello el fin del experimento.

La manera en la que se ve reducida la concentración de analito en las cercanías del electrodo conforme el experimento de voltamperometría avanza queda de manifiesto al observar los perfiles de concentración para FICN y FOCN a diversos tiempos de electrólisis (Figura (48)). Los perfiles de concentración son representaciones de las variaciones en la concentración de un analito en función de la distancia con respecto al electrodo durante el proceso de electrólisis, estos perfiles se obtienen al resolver las ecuaciones de transporte de masa y son una herramienta didáctica muy útil, ya que el comportamiento de la corriente durante la electrólisis se relaciona directamente con estos perfiles. (ecuación (107)).

$$i = nFAD \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} = cte \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (107)$$

Donde i es la corriente, n es el número de electrones, A es la superficie del electrodo, F la constante de Faraday y D el coeficiente de difusión. Como puede observarse la pendiente de esta ecuación viene dada por los perfiles de concentración que son los que determinan la corriente observada.

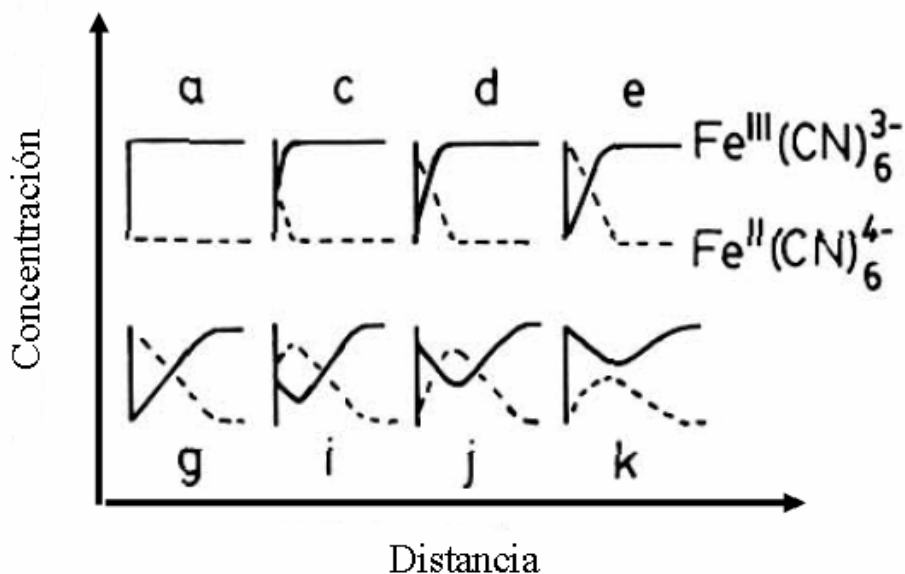


Figura 48. Adaptada de [81]. Perfiles de concentración para FICN y FOCN, durante el experimento de voltamperometría cíclica.

Hasta este momento se ha mencionado que la corriente observada en un voltamperograma depende de los perfiles de concentración, sin embargo en la vida real no se trabaja con concentraciones de las especies redox en la superficie de un electrodo, sino con concentraciones en el seno de la disolución, que son las que podemos medir con facilidad. De acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación (108)), el valor de corriente de pico (i_p) observada experimentalmente en un voltamperograma se relaciona linealmente con la concentración.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} C_0^* \quad (108)$$

La corriente en la ecuación (117) se da en Amperes, cuando el área (A) se expresa en cm^2 , el coeficiente de difusión (D_0) en cm^2/s , La concentración del analito (C_0^*) en mol/cm^3 y la velocidad de barrido (ν) en V/s .

A manera de resumen los parámetros más importantes en un voltamperograma son la corriente de pico anódica (i_{pa}), la corriente de pico catódica (i_{pc}) y sus respectivos potenciales asociados tanto anódicos (E_{pa}) como catódicos (E_{pc}). En un sistema que se considere reversible estas magnitudes se relacionan entre sí como lo indican las ecuaciones (109) a (113).

$$E^{o'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (109)$$

$$\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa} = \frac{0.059}{n} \quad (110)$$

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1 \quad (111)$$

$$E_{p/2} = E_{1/2} + 1.09 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} + \frac{28.0}{n} \text{ mV} \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (112)$$

$$E_p - E_{p/2} = 2.2 \frac{RT}{nF} = \frac{56.5}{n} \text{ mV} \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (113)$$

La ecuación (109) relaciona dos parámetros medibles en voltamperometría cíclica como son E_{pa} y E_{pc} con un parámetro de gran importancia como es el potencial formal de reducción ($E^{o'}$). La ecuación (110) nos permite realizar estimaciones del número de electrones intercambiados (n) además de que la separación de picos es uno de los criterios más empleados para juzgar la reversibilidad de un sistema. La ecuación (111) corresponde a una relación que siempre se cumple en los sistemas reversibles, dado que refleja que todo el material que se oxida o reduce se recupera de vuelta al realizar el barrido de potencial inverso. $E_{p/2}$ corresponde al potencial medido a la mitad de corriente del pico y se relaciona con $E_{1/2}$ un parámetro usado comúnmente en polarografía, que se denomina potencial de media onda y que se localiza a la mitad del pico E_p y el $E_{p/2}$ (Figura 49).

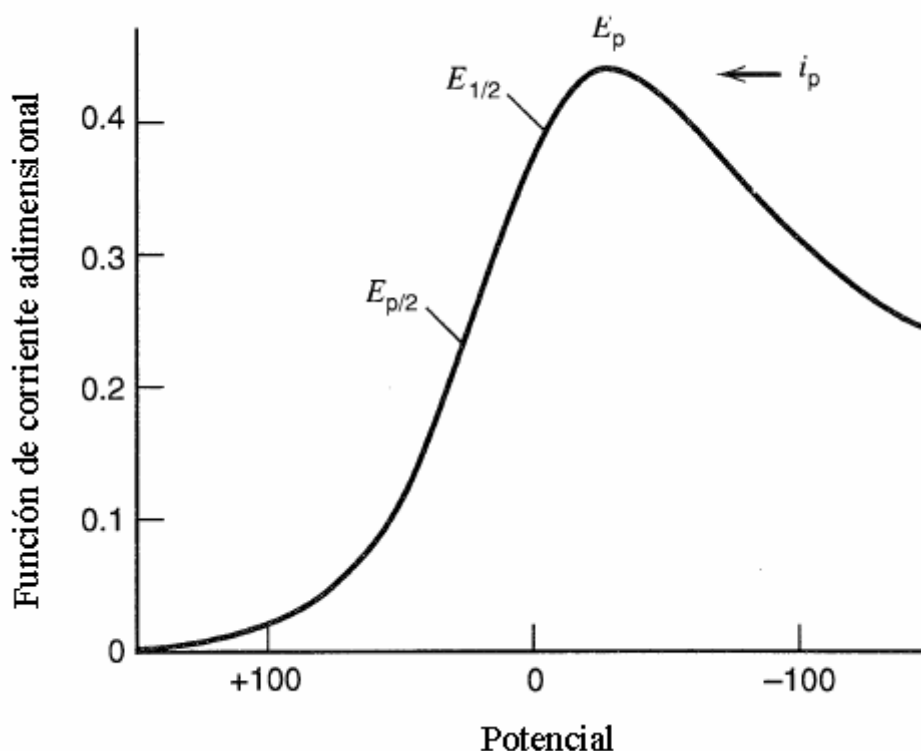


Figura 49. Tomada de [60]. Voltamperograma de barrido lineal en términos de la función de corriente adimensional, que ilustra la relación existente entre los diversos parámetros para un sistema reversible.

Debe tenerse siempre en mente que las ecuaciones descritas en este anexo aplican solamente a sistemas reversibles, es decir de transferencias electrónicas rápidas sin reacciones químicas acopladas y que por lo tanto no son aplicables a los sistemas estudiados en este trabajo. Otro tipo de criterio para asignar la reversibilidad surge de evaluar la función de corriente adimensional del sistema (i^*), la cual debe de ser igual a 0.4463 para sistemas reversibles (ecuación (114)), ya que en el caso de los sistemas quasireversibles ($0.3\nu^{1/2} > k^o > 2.0 \times 10^{-5}\nu^{1/2}$) e irreversibles ($k_s < 2.0 \times 10^{-5}\nu^{1/2}$), se obtienen porcentajes en i^* inferiores incluso al 50%.

$$i^* = \frac{i_p}{nFAc_0^*D_0^{1/2} \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} \nu^{1/2}} = 0.4463 \text{ sólo para sistemas reversibles.} \quad (114)$$

La corriente observada en los voltamperogramas de los sistemas quasireversibles e irreversibles también puede ser descrita de manera similar que en el caso de los sistemas

reversibles, sin embargo ese tema escapa del propósito de este anexo e involucra análisis de la cinética electroquímica del sistema lo que complica mucho los cálculos.

B.1.2 Consideraciones prácticas: Corriente capacitiva y caída óhmica^[80-83].

Al realizar un experimento de voltamperometría cíclica existe una serie de dificultades a considerar que pueden distorsionar la forma de los voltamperogramas. Para poder entender cual es el origen de esos problemas basta visualizar a la celda electroquímica como un circuito eléctrico (Figura 50).

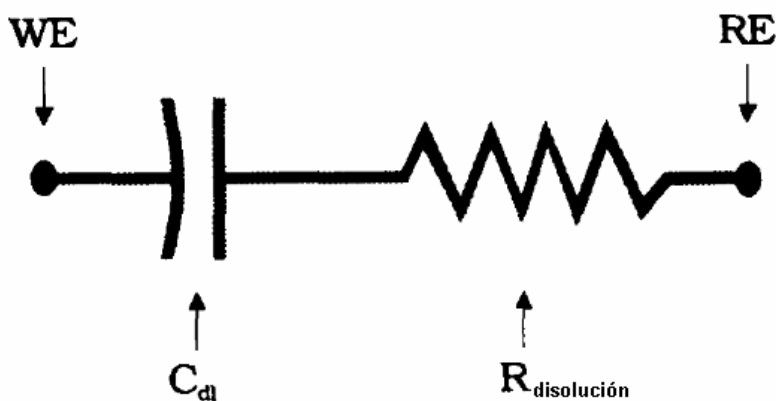


Figura 50. Adaptado de [80]. Representación de una celda electroquímica como un circuito eléctrico.

La interfase electrodo-disolución puede considerarse como un capacitor con un valor de capacitancia C_{dl} , debido a la formación de la doble capa conforme se modifica el potencial durante el experimento acoplado en serie con una resistencia R_U que corresponde a la resistencia que ofrece la disolución.

Como hemos visto hasta ahora los tratamientos teóricos de voltamperometría cíclica asumen un barrido lineal de potencial que se aplica al electrodo de trabajo, sin embargo, la resistencia de la disolución ocasiona una caída de potencial de tal manera que el potencial que leemos en el potencióstato no necesariamente es el potencial real. Así como el potencial sobre el electrodo de trabajo (E_{WE}) corresponde al potencial aplicado por el equipo (E_{appl}) y la contribución de la caída óhmica de la disolución (ecuación (115)).

$$E_{WE} = E_{appl} + iR_u \quad (115)$$

Considerando el efecto que este término adicional de potencial tiene sobre un voltamperograma se tiene que para una corriente catódica E_{WE} es menos negativo que E_{appl} , lo que provoca el desplazamiento del pico hacia valores de potencial más negativos, ocurriendo lo contrario para el caso de la corriente anódica, por lo que en el caso de un sistema reversible el valor de ΔE_p será mayor a 56 mV. Para obtener el potencial de pico corregido en sistemas con valores pequeños de caída de potencial se puede emplear la ecuación (116), para lo cual se requiere medir la resistencia del sistema de trabajo (medio electrolítico y arreglo de la celda).

$$E_{p,real} = E_{med} + iR_{disolución} \quad (116)$$

Donde $E_{p,real}$ corresponde al potencial de pico real, es decir en ausencia de la caída de potencial y E_{med} corresponde al potencial medido que se obtiene del experimento.

Existen diversos métodos para disminuir la caída de potencial entre ellos se encuentran:

- Optimizar la concentración de electrolito soporte.
- Colocar los electrodos de trabajo y de referencia lo más cercano posible.
- Usar electrodos pequeños.

Como se ha mencionado anteriormente la doble capa de iones interaccionando con el disolvente que se forma en la interfase electrodo-disolución, se comporta como un capacitor con un cierto valor de capacitancia denominado C_{dl} . Cuando se aplica un paso de potencial existe cierta corriente que corresponde a la corriente de cargado de la doble capa y que se expresa de acuerdo a la ecuación (117) como:

$$i = \frac{\Delta E}{R} e^{-\frac{t}{RC_{dl}}} \quad (117)$$

Donde ΔE indica la magnitud del salto de potencial, R la resistencia y t el tiempo. Los valores de resistencia y de capacitancia se miden fácilmente a partir del grafico $\ln(i)$ en función del tiempo, donde la ordenada al origen corresponde al valor de $\ln(\Delta E/R)$ y la

pendiente a $-\frac{1}{RC_{dl}}$. La capacitancia para muchos de los electrodos comúnmente empleados en voltamperometría se encuentra entre los 10 a 20 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Para el caso de un barrido de potencial cíclico, como en el caso de la voltamperometría, la situación es un poco más complicada, ya que la capacitancia es una función del potencial, sin embargo las características generales pueden describirse en términos de una capacitancia i-ésima constante (Figura 51). En este caso la corriente capacitiva aumenta con un tiempo característico que la nivela. Al momento de realizar el barrido en la dirección contraria, la corriente capacitiva cambia de signo, pero en todos los casos es proporcional a la velocidad de barrido (ecuación (118)), por lo que el efecto de distorsión sobre el voltamperograma es mayor a velocidades altas.

$$i_{\text{cap}} = C_{dl} \nu \quad (118)$$

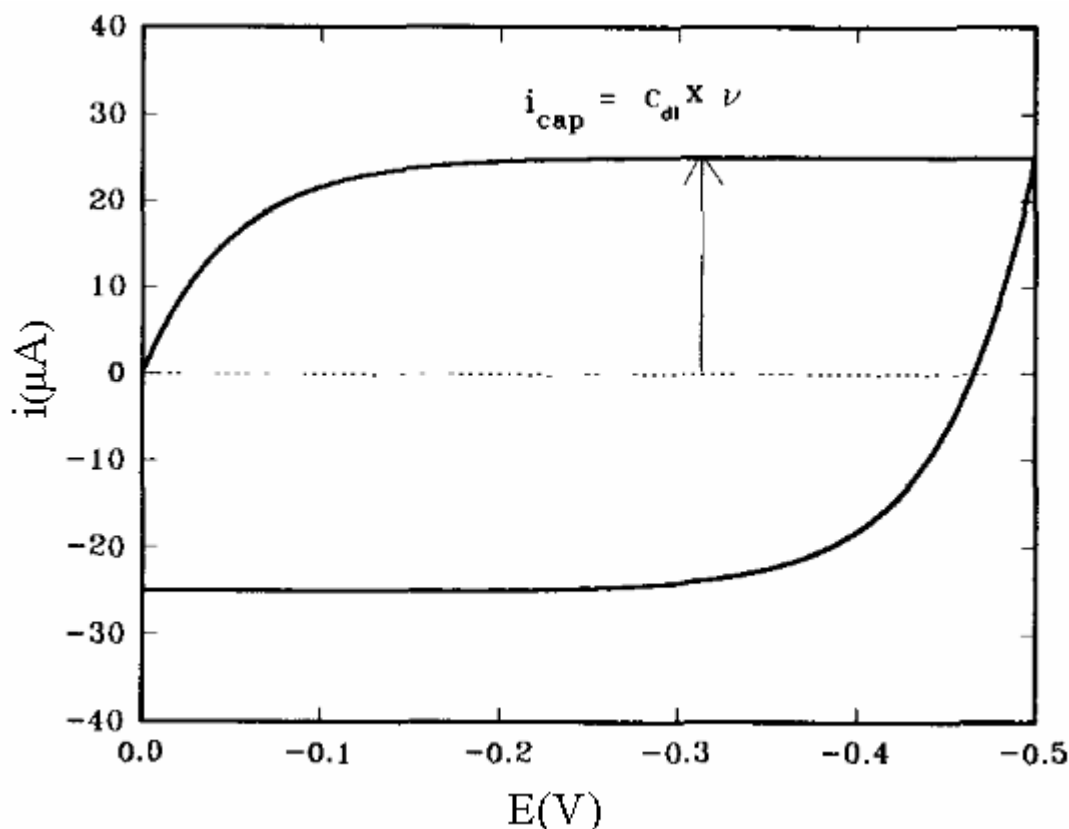


Figura 51. Adaptada de [80]. Respuesta de la corriente de capacitancia para un barrido cíclico de potencial, asumiendo una capacitancia constante.

La corriente capacitiva contribuye en ocasiones significativamente con la corriente observada en los experimentos, dicha contribución puede eliminarse fácilmente ya que en voltamperometría cíclica, como ocurre en el caso de otras técnicas analíticas se registra un “blanco” es decir un voltamperograma de una solución que contenga todos los componentes del sistema a excepción del analito, el cual se resta al voltamperograma cíclico que contiene al analito.

Antes de realizar un estudio voltamperométrico es necesario trabajar sin provocar la electrolisis del disolvente o del electrolito soporte, ya que fuera de esta zona de potencial la corriente crece a niveles que no nos permite observar el comportamiento del analito. Adicionalmente, el realizar este estudio permite verificar la presencia de impurezas que pudieran afectar el experimento. Otro aspecto muy importante es que la ventana de potencial depende en gran medida de la pureza de los disolventes empleados, por ello en ocasiones es necesario recurrir a la purificación de los mismos y de los electrolitos soporte.

B.1.3 Mecanismos electroquímicos ^[80,84]

En esta sección se examina la respuesta de los voltamperogramas, para los mecanismos electroquímicos más simples (Mecanismos EC y ECE). Los mecanismos aquí descritos emplean la notación E-C, donde E corresponde a un paso electroquímico y C a un paso químico que se encuentra acoplado a una reacción de transferencia electrónica, adicionalmente, se emplean subíndices para definir si el paso es reversible (r), irreversible (i) o quasi-reversible (q), por ejemplo la notación E_rC_i denota un mecanismo con un paso electroquímico reversible, seguido de un paso químico irreversible.

B.1.3.1. Mecanismo EC.

La forma de un voltamperograma se puede alterar significativamente si se encuentra una reacción química acoplada interfiriendo con la transferencia electrónica ya sea antes o después del paso electroquímico, otros factores como el grado de reversibilidad y las constantes cinéticas y de equilibrio juegan también un papel muy importante en las desviaciones con respecto a la forma ideal de los voltamperogramas. A pesar de que un paso químico no produce ninguna contribución de carga, puede influenciar los valores

de carga que se obtienen en un equilibrio electroquímico, además dicho equilibrio asociado no se encuentra afectado por el potencial del electrodo.

Se considera a continuación el esquema de reacciones (119) y (120) que corresponden a un mecanismo tipo EC.



En el primer paso (E), una especie reducida (R) se oxida en la superficie del electrodo para generar (O), como producto de la reacción, sin embargo este producto es inestable y reacciona químicamente (C), ya sea consigo mismo, con alguna otra molécula presente o incluso con el disolvente para dar el producto (A), el cual es no electroactivo. Por lo que si la constante de velocidad de la reacción (120) es muy grande en el barrido de potencial inverso no se obtendrá una corriente de respuesta para el paso de oxidación de O a R ya que la especie O ha reaccionado. En algunos casos la reacción acoplada no es tan rápida por lo que dependiendo de la velocidad de barrido es posible observar el pico correspondiente a la oxidación de O.

De manera general un mecanismo tipo EC, presenta las siguientes características:

- La relación entre la corriente catódica a anódica ($\frac{i_{pa}}{i_{pc}}$) es una función de la constante de velocidad de la reacción química acoplada (k_f) y de la velocidad de barrido (v). En la figura 52 se observan los voltamperogramas simulados^[84] considerando un mecanismo tipo EC. La figura 52a) corresponde al efecto que tiene en los voltamperogramas el valor de k_f , donde puede observarse que al incrementar el valor de esta constante, la señal catódica disminuye debido a que se descompone la especie oxidada más rápidamente para formar A. La figura 52b) muestra el efecto de la velocidad de barrido (v) a un valor constante de k_f (10 s^{-1}), como puede observarse se llega a una velocidad de barrido tal que el voltamperograma presenta una señal catódica bien definida, esto debido a que la especie oxidada (O), no tiene tiempo de reaccionar para generar A (reacción

(120)), dado que en cuanto se forma se reduce de nuevo a R, con lo que se obtienen ambas señales, de oxidación y reducción, como en el caso de una transferencia simple de electrones. Así, cuando se obtiene un comportamiento como el que se muestra en la Figura 52 a y b, los voltamperogramas cíclicos pueden analizarse para obtener una estimación del valor de k_f . Los parámetros que usaron los autores^[84] para realizar las simulaciones se especifican al pie en la figura 52.

- El potencial de pico (E_p) para el barrido directo (cuando $\frac{k_f RT}{nFv} > 4$), se encuentra dado por la ecuación (121).

$$E_p = E^\circ - 0.780 \frac{RT}{nF} + \frac{RT}{2nF} \ln \left(\frac{k_f RT}{nFv} \right) \quad (121)$$

Existen descritas en la literatura^[60] curvas de trabajo para determinar k_f , así como programas de simulación digital de experimentos electroquímicos.

A manera de ejemplo dos sistemas reales que siguen este tipo de comportamiento son la reducción del ácido ascórbico a ácido deshidroascórbico^[84], el cual es un producto electroquímicamente inactivo que se forma por reacción acoplada con el agua del medio de reacción y la reducción de la metilcobalamina^[84] que libera un radical metilo y un carbanión estabilizado por el anillo de corrina.

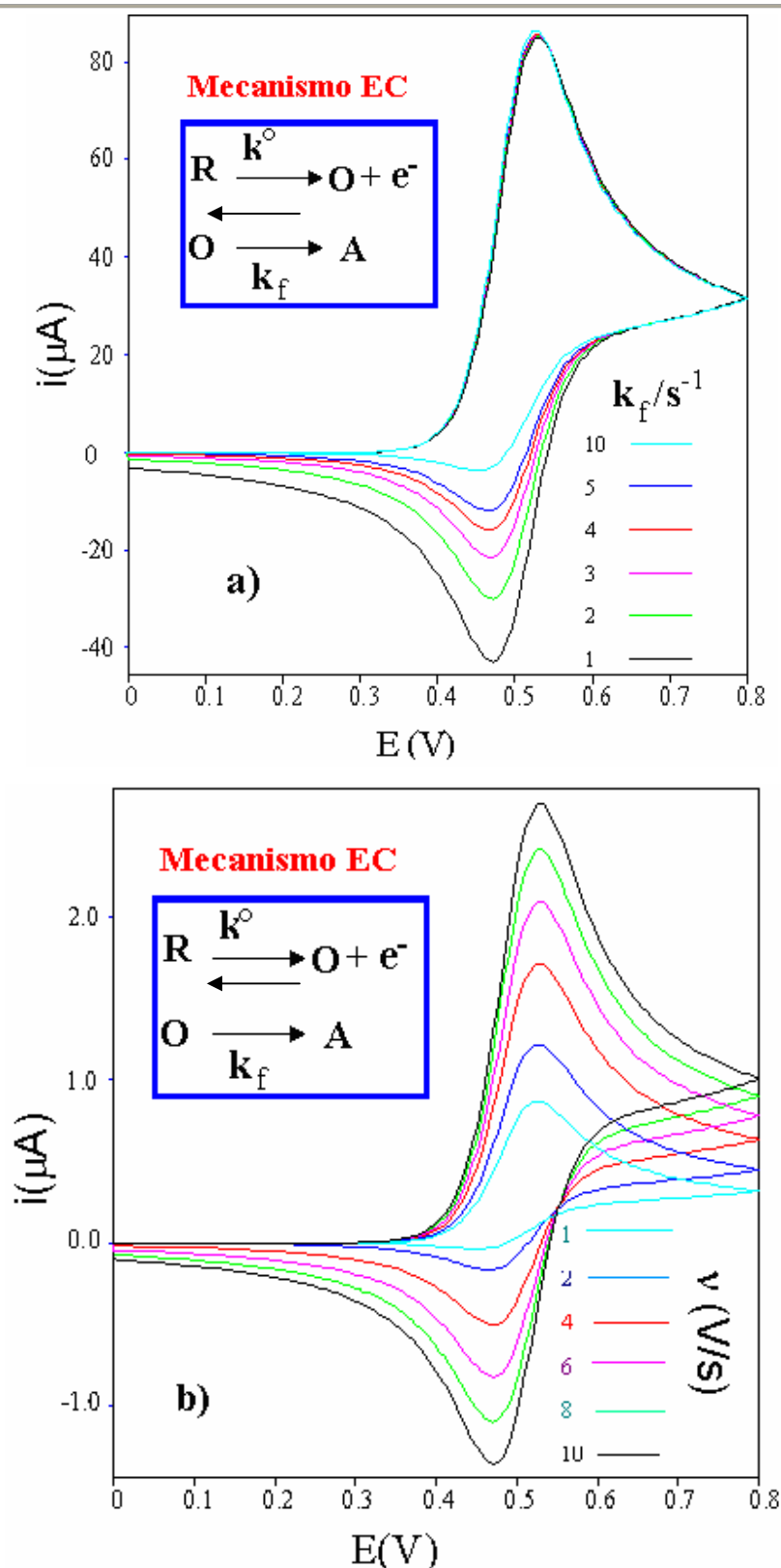
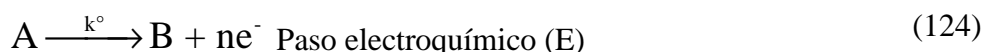
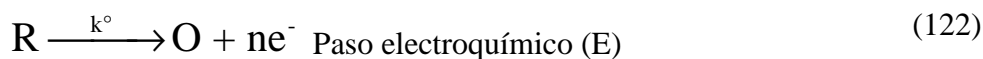


Figura 52. Tomada de [84]. Voltamperogramas cíclicos obtenidos por simulación con lo siguientes parámetros: a) área del electrodo 0.1 cm^2 , $k^\circ = 1 \text{ cm/s}$, $v = 1 \text{ V/s}$, $E^\circ = 0.5 \text{ V}$, $D_0 = D_R = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, los valores de k_f fueron de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 s^{-1} . b) área del electrodo (A) 0.1 cm^2 , $k^\circ = 1 \text{ cm/s}$, $E^\circ = 0.5 \text{ V}$, $D_0 = D_R = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, $k_f = 10 \text{ s}^{-1}$, los valores de v son: 1, 2, 4, 6, 8 y 10 V/s .

B.1.3.2 Mecanismo ECE.

Otro mecanismo que se presenta frecuentemente es el mecanismo ECE, este es un mecanismo que ocurre en tres pasos representados por las reacciones (122) a (124).



El primer paso es un proceso electroquímico que da lugar a un producto inestable (O) que reacciona químicamente para generar a la especie A, que es a su vez una especie electroactiva, por lo que puede reaccionar para formar el compuesto B.

Durante el barrido de potencial inverso, un nuevo pico (II_c) se detecta en el voltamperograma, el cual corresponde al proceso redox de las nuevas especies formadas. Adicionalmente, la segunda reacción electroquímica (reacción (124)) sólo puede ser observada si la nueva especie (A), es más difícil de oxidar que el compuesto padre.

Cuando se estudia una reacción ECE por voltamperometría cíclica debe analizarse todo el proceso secuencialmente, comenzando por la transferencia electrónica inicial que se esté llevando a cabo. Posteriormente estudiar el tiempo de ventana que permite que la reacción acoplada ocurra, considerando que, como en el caso del mecanismo EC, si se trabaja a valores de v altos, es posible desacoplar la reacción química. Finalmente se estudian los efectos que provoca el permitir que la reacción acoplada se lleve a cabo en los parámetros del voltamperograma.

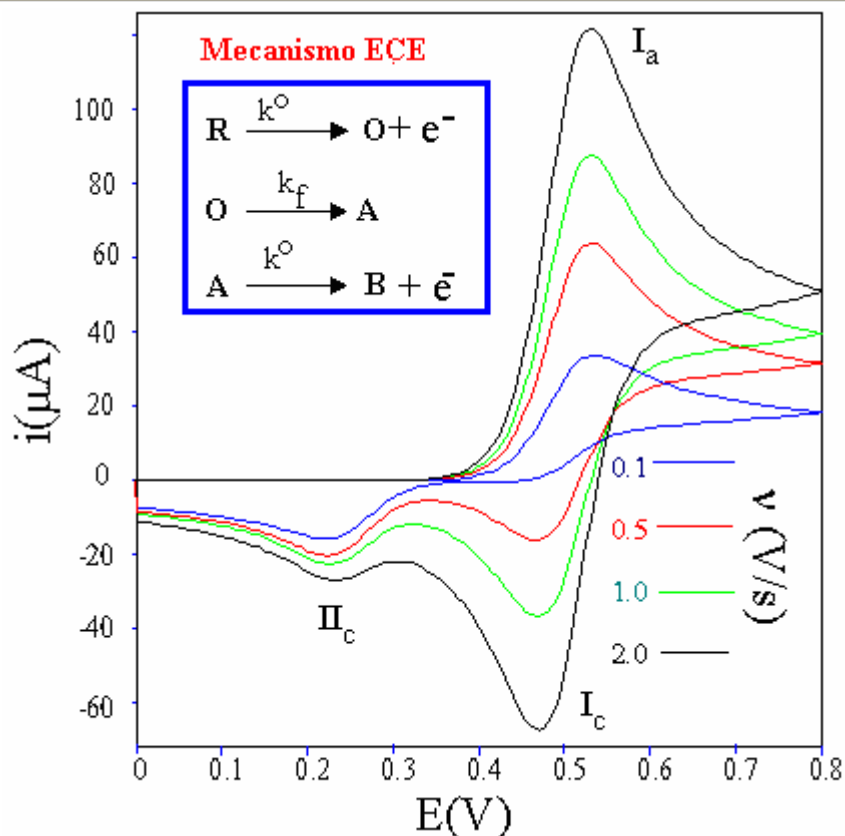


Figura 53. Adaptada de [84]. Voltamperogramas cíclicos obtenidos por simulación, en los que se ilustra un mecanismo tipo ECE, para diversos valores de $\nu = 0.1, 0.5, 1.0$ y 2.0 V/s. Los parámetros que se usaron en esta simulación son: área del electrodo 0.1 cm^2 , $k^\circ = 1 \text{ cm/s}$, $k_f = 1 \text{ s}^{-1}$, $E_1^0 = 0.5 \text{ V}$, $E_2^0 = 0.25 \text{ V}$ y $D_0 = D_R = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$

La Figura 53 muestra una serie de voltamperogramas cíclicos para un mecanismo ECE obtenidos por simulación a diferentes velocidades^[84]. En este caso la oxidación del compuesto inicial conduce a una especie inestable (O) que se convierte en un producto electroactivo (A) y que puede reducirse a potenciales por debajo de 0.3 V , lo que lleva a la aparición de la segunda onda de reducción (II_c). Los parámetros de simulación para estos voltamperogramas se muestran al pie de la figura 53.

El siguiente esquema de reacciones (Figura 54) es un ejemplo de sistema que se comporta de acuerdo a un mecanismo tipo ECE.

En este ejemplo el *p*-diaminobenceno sufre una oxidación de dos electrones para formar la imina diprotonada correspondiente, la que en medio acuoso esta imina se hidroliza rápidamente para formar la quinona, es un producto electroactivo que por reducción en un proceso de dos electrones produce el *p*-hidroxibenceno. Cabe mencionar que todos

los compuestos de la figura 54 son electroactivos y que la posición exacta de los picos será dependiente de los valores individuales de E° para cada par, por lo que la forma del voltamperograma dependerá de los valores de v usados en el experimento y del valor de k_f de las reacciones químicas acopladas.

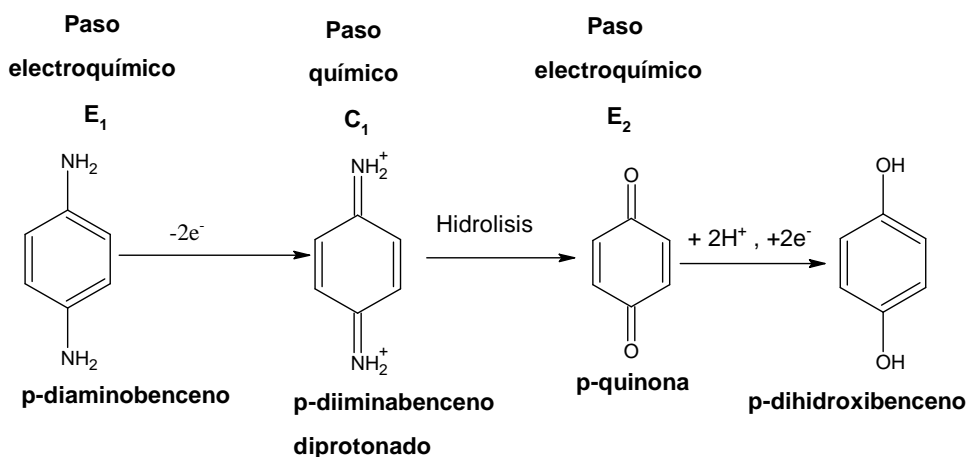


Figura 54. Esquema de reacciones ejemplificando un mecanismo de reacción ECE.

B.2 Electrólisis a potencial controlado^[60].

Como lo dice su nombre una electrólisis a potencial constante, consiste en fijar el potencial del electrodo de trabajo a un valor determinado donde se lleve a cabo un proceso electroquímico de interés, durante cierta cantidad de tiempo.

A diferencia de la voltamperometría cíclica y otras técnicas analíticas que no producen cambios apreciables en la concentración del analito en el seno de la disolución, la electrólisis a potencial controlado hace uso de electrodos de gran área, con la finalidad de oxidar o reducir al analito de interés en su totalidad, por ende se requieren largos tiempos de electrólisis (minutos a horas) y mantener el experimento en agitación (transporte de masa eficaz) a fin de que la mayor parte de analito llegue hacia la superficie del electrodo y pueda reaccionar. El intervalo de valores de potencial en el cual se puede llevar a cabo de manera cuantitativa la reacción, se puede calcular fácilmente con la ecuación (125), que parte de considerar la fracción (x) de O reducido para un proceso donde ambas especies redox (O y R), son solubles en el disolvente empleado. La ecuación (125) se deriva de la ecuación de Nernst (Ecuación (106)).

$$E = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{(1-x)}{x} \right] \quad (125)$$

La electrólisis a potencial controlado tiene distintas aplicaciones, como la electrosíntesis, la electrogravimetría y la coulombímetría, esta última técnica se empleó en este trabajo, con la finalidad de determinar la cantidad total de electrones intercambiados en la electrólisis de los compuestos *o*-difénolicos (Ver sección 5.2.2), mediante el uso de las Leyes de Faraday (Ecuación (48)).

El comportamiento de la corriente en función del tiempo, para la electrólisis a potencial controlado parte del hecho de que la concentración en el seno de la disolución (C_0^*), es una función del tiempo, que decrece conforme la electrólisis avanza.

Si se considera al igual que lo hemos estado haciendo con voltamperometría, el proceso de transferencia reversible de n electrones, donde O se reduce a R (Ecuación (119)), en un potencial de valor E_c , tal que nos encontramos en la región de corriente límite (i_l). La corriente observada en todo momento se encuentra determinada por la ecuación (126).

$$i_l(t) = nFAm_0C_0^*(t) \quad (126)$$

Donde n es el número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday, A el área del electrodo, m_0 el coeficiente de transporte de masa de la especie O, y C_0^* , la concentración de la especie oxidante en el seno de la solución que es también función del tiempo.

Si consideramos una eficiencia del 100% en el proceso redox antes descrito, obtenemos de la ecuación (127), que el valor de corriente límite es proporcional a la cantidad de materia electrolizada del analito, es decir, a la razón de cambio que existe en los moles de O en función del tiempo $\left(\frac{dN_0(t)}{dt} \right)$.

$$i_1(t) = nF \left(\frac{dN_0(t)}{dt} \right) \quad (127)$$

Donde N_0 , es el número total de moles de la especie O. Adicionalmente, si se asume que la solución es totalmente homogénea en el espacio, esto es despreciando el valor de la capa de difusión en las cercanías del electrodo donde $C_0 \neq C_0^*$, es posible obtener la ecuación (127), en función de C_0^* y se llega a la ecuación (128).

$$i_1(t) = nFV \left(\frac{dC_0^*(t)}{dt} \right) \quad (128)$$

Donde V corresponde al volumen de la disolución, ahora bien si igualamos la ecuación (128) con la ecuación (126) obtenemos la ecuación (129) donde $p = m_0A/V$ y es un término análogo a una constante cinética de primer orden, al resolver la ecuación diferencial e imponer como condición de frontera $C_0^*(t) = C_0^*(0)$ a $t = 0$, se obtiene la ecuación (130).

$$\frac{dC_0^*(t)}{dt} = -\frac{m_0A}{V} C_0^* = -pC_0^* \quad (129)$$

$$C_0^*(t) = C_0^*(0)e^{-pt} \quad (130)$$

De manera análoga el comportamiento de la corriente en función del tiempo está dado por la ecuación (131).

$$i(t) = i(0)e^{-pt} \quad (131)$$

Donde $i(0)$ es la corriente inicial. De la ecuación (130) y (131), se desprende el hecho que durante la electrólisis a potencial constante, la corriente y concentración decaen exponencialmente en función del tiempo, como en el caso de una reacción de primer

orden.(Figura 55) y de igual manera puede determinarse el tiempo de electrolisis mediante la ecuación (132).

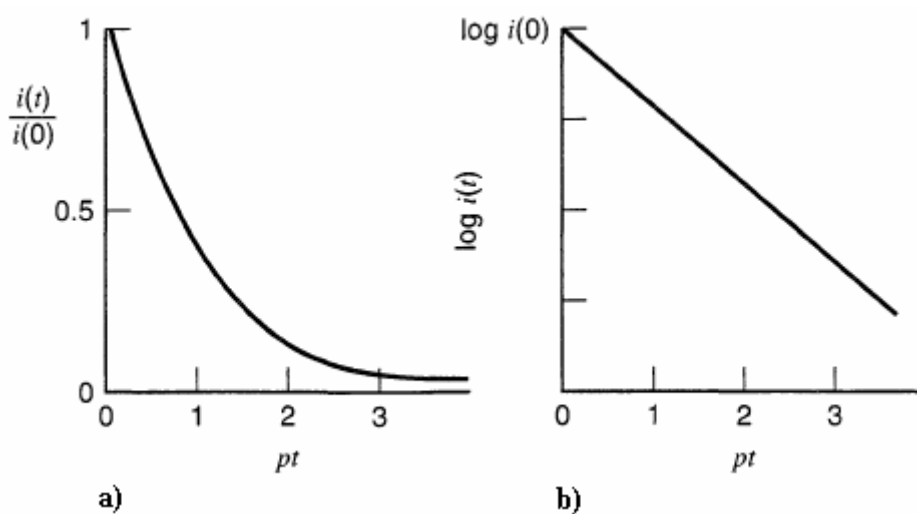


Figura 55. Comportamiento de la corriente en un experimento de electrólisis a potencial controlado:
a) Decaimiento exponencial de la corriente de igual manera que ocurre en un proceso cinético de primer orden. b) El mismo decaimiento en escala logarítmica.

$$-\frac{p}{2.3} t = \log \left[\frac{C_0^*(t)}{C_0^*(0)} \right] = \log \left[\frac{i(t)}{i(0)} \right] \quad (132)$$